

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PAMELA SUELLEN SALVADOR DUTRA

**SENSIBILIDADE AO IPRODIONA, RESISTÊNCIA MÚLTIPLA AOS FUNGICIDAS  
IDM'S, MBC'S E IQE'S E ADAPTABILIDADE DE DIFERENTES FENÓTIPOS DE  
*Monilinia fructicola***

CURITIBA

2018

PAMELA SUELLEN SALVADOR DUTRA

**SENSIBILIDADE AO IPRODIONA, RESISTÊNCIA MÚLTIPLA AOS FUNGICIDAS  
IDM'S, MBC'S E IQE'S E ADAPTABILIDADE DE DIFERENTES FENÓTIPOS DE  
*Monilinia fructicola***

Dissertação apresentada como requisito parcial à  
obtenção do grau de Mestre em Agronomia, no Curso  
de Pós-Graduação em Produção Vegetal, Setor de  
Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profª Dra. Louise Larissa May De Mio  
Co-orientador: Profº Dr. Cristiano Nunes Nesi

CURITIBA

2018

Dutra, Pamela Suellen Salvador  
D978      Sensibilidade ao Iprodiona, resistência múltipla aos fungicidas  
IDM'S, MBC'S e IQE'S e adaptabilidade de diferentes fenótipos  
de *Monilinia fructicola* / Pamela Suellen Salvador Dutra.  
- Curitiba, 2018.  
xvii, 122 f.: il., grafs., tabs.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Louise Larissa May De Mio  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná.  
Setor de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em  
Agronomia (Produção Vegetal).

1. Pêssego - Cultivo. 2. Pêssego - Doenças e pragas - Controle.  
3. Produtos químicos agrícolas - Pêssego. I. May De Mio, Louise  
Larissa. II. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências  
Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Produção  
Vegetal). III. Título.

CDU 632: 634.25



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO AGRONOMIA  
(PRODUÇÃO VEGETAL)

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em AGRONOMIA (PRODUÇÃO VEGETAL) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **PAMELA SUELLEN SALVADOR DUTRA** intitulada: **SENSIBILIDADE AO IPRODIONA, RESISTÊNCIA MÚLTIPLA AOS FUNGICIDAS IDM'S, MBC'S E IQE'S E ADAPTABILIDADE DE DIFERENTES FENÓTIPOS DE *Monilinia fruticola***, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 29 de Janeiro de 2018.

LOUISE LARISSA MAY-DE-MIO

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

PAULO DOS SANTOS MARIA LICHTENBERG

Avaliador Externo (UC-DAVIS)

CRISTIANO NUNES NESI

Avaliador Externo (EPAGRI)

WAGNER VICENTE PEREIRA

Avaliador INTERNO (UFPR – POS DOC)

Dedico à minha avó, Dair Maria  
Lúcia Salvador (*In memoriam*)

## **AGRADECIMENTOS**

À Denize, minha mãe, que me deu todo amor e carinho e que não mediu esforços para sempre me ajudar no que precisei, acreditando sempre na minha capacidade e perseverança.

Ao meu avô Levi, por ter me acolhido em sua casa com bom grado e sempre se preocupou com o meu bem estar.

Aos meus outros familiares, principalmente a minha avó Mirtes e minhas tias do coração Cinthia, Cristina e Corine, que me deram suporte e incentivaram a ir atrás dos meus sonhos.

Ao meu namorado, Daniel, que permaneceu ao meu lado nos momentos difíceis e que não mediu esforços para me ajudar e apoiar sempre que necessitei.

À minha orientadora e professora Louise Larissa May De Mio, por ter despertado o interesse e a paixão que hoje tenho pela fitopatologia, pelos seus ensinamentos e também pela confiança transmitida na elaboração deste trabalho.

Ao Dr Cristiano Nunes Nesi, pela oportunidade de co-orientação, sugestões, e apoio no decorrer deste trabalho.

À Universidade Federal do Paraná pela oportunidade da realização do curso Mestrado e ao Programa de Pós-graduação em Agronomia - Produção Vegetal, em especial ao Coordenador Profº Dr. Cicero Deschamps e às secretárias do programa, Lucimara e Lucia pela disposição em me ajudar e esclarecer dúvidas sempre em que precisei.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por conceder a bolsa de Mestrado.

Aos técnicos de Laboratório Izabel, Simone e Tiago que dedicaram do seu tempo para me ajudar nas montagens dos experimentos.

Aos amigos de laboratório, Jhulia, Camilla, Eliane, Mônica, Guilherme, Glória, Marlon, Juliana, Heloisa, Carlos, Rafaele, Thiago, Wagner, Meira, Felipe e Alex que estavam presentes e acompanharam minhas dificuldades durante o período de mestrado. Obrigada pelos momentos de risadas e companheirismo!!!!

A Tamara Takahashi, pela amizade de longa data, pelos incentivos, conselhos e parceria.

À Profª Lilian Amorim, da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz por ser exemplo de pesquisadora e por ter cedido espaço e equipamentos para realização dos experimentos enquanto estive em Piracicaba.

Aos colegas da ESALQ Juliana e André, e a técnica Sílvia que me ensinaram e auxiliaram nos experimentos durante minha permanência nesta instituição.

Mais uma vez, a todos os meus sinceros agradecimentos!!!!

“Não sei o que possa parecer aos olhos do mundo, mas aos meus pareço apenas ter sido como um menino brincando à beira-mar, divertindo-me com o fato de encontrar de vez em quando um seixo mais liso ou uma concha mais bonita que o normal, enquanto o grande oceano da verdade permanece completamente por descobrir à minha frente”.

Isaac Newton



## RESUMO

O controle de *Monilinia fructicola*, agente causal da podridão-parda do pessegueiro, é realizado principalmente com fungicidas dos grupos Metil Benzimidazóis Carbamatos (MBC), Dicarboximidas (DC), Inibidores da Quinona Externa (IQe) e Inibidores da Desmetilação C14 (IDM). A dificuldade do manejo da doença está relacionada à seleção de isolados de *M. fructicola* resistentes a esses grupos e isso já tem sido demonstrado a partir de estudos em diversos países. No Brasil, não há estudos sobre a sensibilidade de *M. fructicola* ao fungicida iprodiona (DC's) e pouco se sabe sobre fenótipos com sensibilidade reduzida a um ou mais produtos. Isso atesta a necessidade da avaliação de resistência múltipla entre grupos, além de uma melhor compreensão da adaptabilidade desses fenótipos resistentes. Dessa maneira, os objetivos desse trabalho foram: (a) investigar a sensibilidade dos isolados de *M. fructicola* ao iprodiona, (b) verificar a ocorrência da resistência múltipla de *M. fructicola* aos fungicidas IDM's, MBC's e IQe's, avaliando-se os fenótipos encontrados quanto à sua adaptabilidade e (c) avaliar a ocorrência da resistência prática em frutos tratados com os fungicidas. A sensibilidade aos fungicidas foi estudada a partir de testes *in vitro* (doses discriminatórias e EC<sub>50</sub>) avaliando-se isolados de *M. fructicola* coletados nos estados de São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul, entre os anos de 2003 a 2017. Os fenótipos foram elaborados a partir da combinação do padrão de resistência (S- sensível ou R- resistente) entre os fungicidas tiofanato-metílico (TF), tebuconazol (TEB) e azoxistrobina(AZO). Os componentes de adaptabilidade *in vitro* (crescimento micelial, sensibilidade osmótica, germinação de conídios e esporulação) e *ex vivo* (agressividade em pétalas e frutos) foram determinados e comparados entre os fenótipos encontrados. Todos os isolados de *M. fructicola* apresentaram alta sensibilidade ao iprodiona e a EC<sub>50</sub> dos isolados variou entre 0,11 a 1,05 µg/mL. Foi encontrada eficiência de controle maior que 85% nos frutos inoculados com isolados de *M. fructicola* e tratados com iprodiona. A frequência de ocorrência de isolados resistentes ao TF, TEB e AZO foi de 43%, 33% e 26%, respectivamente. Foram identificados oito diferentes fenótipos na população, sendo os três mais recorrentes TF<sub>S</sub> TEB<sub>S</sub> AZO<sub>S</sub> (33,3%), TF<sub>S</sub> TEB<sub>R</sub> AZO<sub>R</sub> (21,6%) e TF<sub>R</sub> TEB<sub>S</sub> AZO<sub>S</sub> (19,6%). Além disso, a maioria dos fenótipos resistentes não sofrem custos adaptativos e exibem crescimento micelial, produção de conídios, germinação *in vitro* e agressividade *ex vivo* superiores ou iguais ao fenótipo sensível (TF<sub>S</sub> TEB<sub>S</sub> AZO<sub>S</sub>). Teste com inoculação em frutos tratados com diferentes fungicidas confirmaram cinco fenótipos classificados *in vitro* pelas doses discriminatórias.

**Palavras-chave:** Pessegueiro; Podridão-parda; Controle Químico; Manejo de Resistência

## ABSTRACT

Control of *Monilinia fructicola*, the causal agent of brown rot in peaches, is mainly performed with fungicides from the group of Methyl Benzimidazole Carbamates (MBC), Dicarboximides (DC), Quinone Outside Inhibitors (QoI) and Demethylation C14 Inhibitors (DMI). The difficulty on the management of the disease is related to the emergence of *M. fructicola* resistant isolates to these fungicides, which has already been demonstrated from scientific studies in several countries. In Brazil, there are no studies on the sensitivity of *M. fructicola* to the fungicide iprodione (DC) and little is known about phenotypes with reduced sensitivity to one or more products. This testifies to the need for multiple resistance assessment among groups, in addition to a better understanding of the adaptability of these resistant phenotypes. Thus, the objectives of this study were: (a) to investigate the sensitivity of *M. fructicola* isolates to iprodione, (b) to verify the occurrence of multiple resistance of *M. fructicola* to DMI's, MBC's and QoI's; evaluating the phenotypes fitness components and (c) testify the occurrence of practical resistance in fruits treated with fungicides. The sensitivity to fungicides was studied from *in vitro* tests (discriminatory doses and EC<sub>50</sub>) evaluating isolates of *M. fructicola* collected in the states of São Paulo, Paraná and Rio Grande do Sul, from 2003 to 2017. The fitness components *in vitro* (mycelial growth, osmotic sensitivity, conidia germination and sporulation) and *ex vivo* (aggressiveness in petals and fruits) were determined and compared among the phenotypes. No isolate resistant to iprodione was found in the historical population of *M. fructicola* and the EC<sub>50</sub> of the isolates ranged from 0.11 to 1.05 µg/mL. The results showed a frequency of isolates resistant to thiophanate-methyl (TM), tebuconazole (TEB) and azoxystrobin (AZO) of 43%, 33% and 26%, respectively. Eight different phenotypes were identified in the population, with the most frequent being TF<sub>S</sub> TEB<sub>S</sub> AZO<sub>S</sub> (33, 3%), TF<sub>S</sub> TEB<sub>R</sub> AZO<sub>R</sub> (21, 6%) and TF<sub>R</sub> TEB<sub>S</sub> AZO<sub>S</sub> (19, 61%). In addition, most of the resistant phenotypes exhibited mycelial growth, conidial production, *in vitro* germination and *ex vivo* aggressiveness greater than or equal to the sensitive phenotype (TF<sub>S</sub> TEB<sub>S</sub> AZO<sub>S</sub>), except for the phenotype with triple resistance (TF<sub>R</sub> TEB<sub>R</sub> AZO<sub>R</sub>), which presented all *in vitro* components lower than other phenotypes. Inoculation essays on fruits treated with different fungicides confirmed five phenotypes classified *in vitro* by discriminatory doses.

**Keywords:** Peach; Brown Rot; Chemical Control; Resistance Management

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1-</b> PRODUÇÃO DE PÊSSEGOS (A) E TOTAL DE ÁREA PLANTADA COM PESSEQUEIRO N0 BRASIL (B).....	20
<b>FIGURA 2-</b> PODRIDÃO (A), MUMIFICAÇÃO DOS FRUTOS (B) CANCRO NOS RAMOS E QUEIMA.....	22
<b>FIGURA 3 -</b> MUNICÍPIOS DE COLETAS DOS ISOLADOS DE <i>Monilinia fructicola</i> . .....	63
<b>FIGURA 4-</b> FREQUÊNCIA DE OCORRÊNCIA DOS DIFERENTES FENÓTIPOS DE <i>Monilinia fructicola</i> ENCONTRADOS A PARTIR DE DOSES DISCRIMINATÓRIAS de 1 $\mu\text{l.mL}^{-1}$ , 0,3 $\mu\text{l.mL}^{-1}$ e 1 $\mu\text{l.mL}^{-1}$ PARA TIOFANATO-METÍLICO (TF), TEBUCONAZOL (TEB) E AZOXISTROBINA (AZO), RESPECTIVAMENTE. ....	77
<b>FIGURA 5-</b> FREQUÊNCIA DE ISOLADOS DE <i>Monilinia fructicola</i> SENSÍVEIS (S) E RESISTENTES (R) AOS FUNGICIDAS DOS GRUPOS METIL BENZIMIDAZÓIS CARBAMATOS (MBC'S) (B), INIBIDORES DA DESMETILAÇÃO C14 (IDM'S) (C) E INIBIDORES DA QUINONA EXTERNA (IQE'S) (D) .....	77
<b>FIGURA 6-</b> CURVAS AJUSTADAS DO DIÂMETRO DA COLÔNIA (mm) NOS DIFERENTES FENÓTIPOS DE <i>Monilinia fructicola</i> PELO MODELO DE MICHAELIS-MENTEN MODIFICADO (ZEVIANI, 2013), EM FUNÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE NaCl .....	81
<b>FIGURA 7-</b> ESTIMATIVAS DE KAPLAN-MEIER PARA AS FUNÇÕES DE SOBREVIVÊNCIA DESCREVENDO O TEMPO PARA EXPRESSÃO DOS SINTOMAS (A) E SINAIS (B) EM FRUTOS INOCULADOS COM <i>Monilinia fructicola</i> . ....	83
<b>FIGURA 8-</b> ESTIMATIVAS PONTUAIS DE FRAGILIDADE (ANÁLISE DE RISCO) DOS ISOLADOS DE <i>Monilinia fructicola</i> APRESENTAREM SINTOMAS (A) E SINAIS (B) EM FRUTOS E RESPECTIVOS INTERVALOS COM 95% DE CONFIANÇA.....	84
<b>FIGURA 9 -</b> PLUG MICELIAL DE 5 MM COLETADOS DE COLÔNIAS DE 7 DIAS DE <i>Monilinia fructicola</i> EM MEIO BDA SEM FUNGICIDA (A) E EM MEIO BDA COM 5 $\mu\text{g/mL}$ DE IPRODIONA APÓS 5 DIAS .....	115

<b>FIGURA 10-</b> METODOLOGIA UTILIZADA PARA OS EXPERIMENTOS EM FRUTOS <i>in natura</i> . A. DESINFESTAÇÃO DOS FRUTOS B. FRUTOS DEIXADOS AO AR LIVRE PARA COMPLETA SECAGEM. C. TRATAMENTO DOS FRUTOS COM OS FUNGICIDAS. D. FRUTOS INDIVIDUALIZADOS E DEIXADOS EM RECIPIENTES PLÁSTICOS EM SALA COM TEMPERATURA CONTROLADA (25°C± 2).....	116
<b>FIGURA 11-</b> METODOLOGIA UTILIZADA PARA OS EXPERIMENTOS EM FRUTOS <i>in natura</i> . A. INOCULAÇÃO DE <i>M. fructicola</i> NOS FRUTOS COM 40 µL DE SUSPENSÃO NA CONCENTRAÇÃO DE 10 <sup>5</sup> CONÍDIOS. B. PERÍODO DE INCUBAÇÃO (TEMPO DECORRIDO ENTRE A INOCULAÇÃO ATÉ O APARECIMENTO DO SINTOMA CAUSADO POR <i>M. FRUCTICOLA</i> ). C. PERÍODO DE LATÊNCIA (TEMPO DECORRIDO ENTRE A INOCULAÇÃO ATÉ O APARECIMENTO DOS SINAIS/ ESPORULAÇÃO DE <i>Monilinia fructicola</i> ). D. MEDIÇÃO DO DIÂMETRO DA LESÃO NO 4º DIA APÓS INOCULAÇÃO.....	117
<b>FIGURA 12-</b> METODOLOGIA UTILIZADA PARA DETERMINAÇÃO DA EC <sub>50</sub> . A. PLACAS DE POLIESTIRENO 15X15MM CONTENDO MEIO BDA +ÁGAR. B. APARELHO SPIRAL PLATE. C. COLÔNIA DE <i>Monilinia fructicola</i> COM 3 DIAS DE IDADE CORTADAS EM TIRAS. D. TIRAS TRANSFERIDAS PARA O MEIO COM E SEM O FUNGICIDA. E. MEDIÇÃO DO CRESCIMENTO RADIAL DA COLÔNIA.....	118
<b>FIGURA 13-</b> METODOLOGIA UTILIZADA PARA DETERMINAÇÃO DA AGRESSIVIDADE DOS FENÓTIPOS DE <i>Monilinia fructicola</i> EM PÉTALAS. A. FLORES DE PESSEGUEIRO. B. PÉTALAS DESTACADAS E COLOCADAS EM NÚMERO DE 10 EM CAIXAS TIPO <i>gerbox</i> COM PEDAÇOS UMEDECIDOS DE ALGODÃO. C. DEPOSIÇÃO DE 20µL DE SUSPENSÃO DE ESPOROS (5X10 <sup>3</sup> ) DE <i>M. fructicola</i> NO CENTRO DE CADA PÉTALAS. D. SURGIMENTO DOS SINTOMAS EM PÉTALAS E AVALIAÇÃO DA INCIDÊNCIA. ....	119

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b>	–INFORMAÇÕES DOS ISOLADOS DE <i>Monilinia fructicola</i> UTILIZADOS NESSE ESTUDO .....	42
<b>TABELA 2</b>	– PERCENTAGEM DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL (%ICM) E FENÓTIPOS OBTIDOS A PARTIR DA DOSE DISCRIMINATÓRIA DE 5 µg/ml DE IPRODIONA. ....	47
<b>TABELA 3</b>	- CONCENTRAÇÃO EFETIVA PARA INIBIÇÃO DE 50% DO CRESCIMENTO MICELIAL DE UMA POPULAÇÃO DE ISOLADOS DE <i>Monilinia fructicola</i> PARA O FUNGICIDA IPRODIONA.....	48
<b>TABELA 4</b>	- VIABILIDADE DE CONÍDIOS DE <i>M. fructicola</i> , INCIDÊNCIA E EFICIÊNCIA DO CONTROLE DA PODRIDÃO-PARDA EM PÊSSEGOS TRATADOS COM IPRODIONA .....	49
<b>TABELA 5</b>	– IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS DE <i>M. fructicola</i> E INFORMAÇÕES DA ORIGEM DE COLETA (ANO, ESTADO, CULTIVAR E PARTE DA PLANTA) .....	64
<b>TABELA 6</b>	- INFORMAÇÕES SOBRE OS FUNGICIDAS E METODOLOGIAS UTILIZADAS PARA AVALIAR A SENSIBILIDADE DE <i>Monilinia fructicola</i> UTILIZANDO DOSES DISCRIMINATÓRIAS.....	66
<b>TABELA 7</b>	- INFORMAÇÕES DOS FUNGICIDAS UTILIZADOS PARA DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE de <i>Monilinia frutícola</i> AOS INIBIDORES DA DESMETILAÇÃO C14 (IDM’S) E METIL BENZIMIDAZÓIS CARBAMATOS (MBC’S) .....	68
<b>TABELA 8</b>	- INFORMAÇÕES DOS ISOLADOS DE <i>Monilinia fructicola</i> SELECIONADOS PARA OS ENSAIOS DE ADAPTABILIDADE....	69
<b>TABELA 9</b>	- PADRÃO DE RESISTÊNCIA DE ISOLADOS DE <i>Monilinia fructicola</i> AO TIOFANATO-METÍLICO, TEBUCONAZOL E AZOXISTROBINA E CLASSIFICAÇÃO DOS FENÓTIPOS.....	75
<b>TABELA 10</b>	- DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO EFETIVA (EC <sub>50</sub> ) DOS ISOLADOS DE <i>Monilinia fructicola</i> AOS FUNGICIDAS TIOFANATO-METÍLICO, TEBUCONAZOL E AZOXISTROBINA .....	78
<b>TABELA 11</b>	- DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO EFETIVA (EC <sub>50</sub> ) DE ISOLADOS DE <i>Monilinia fructicola</i> AOS FUNGICIDAS IDM’S PELO	

MÉTODO DO DILUIÇÃO EM GRADIENTE ESPIRAL (AMIRI; HEATH; PERES 2013).....	79
<b>TABELA 12</b> - COMPARAÇÃO DOS FENÓTIPOS DE <i>Monilinia fructicola</i> QUANTO AOS COMPONENTES DE ADAPTABILIDADE <i>in vitro</i> E AGRESSIVIDADE <i>ex vivo</i> .....	80
<b>TABELA 13</b> - ESTIMATIVA DOS PARÂMETROS A PARTIR DO MODELO DE MICHAELIS-MENTEN MODIFICADO (ZEVIANI, 2013) E AJUSTADO PARA O DIÂMETRO DA COLÔNIA EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NaCl PELO), INTERVALO DE CONFIANÇA DOS PARÂMETROS (95%) E COEFICIENTE DE DETERMINAÇÃO DAS CURVAS AJUSTADAS (R <sup>2</sup> )......	81
<b>TABELA 14</b> - DIÂMETRO DA LESÃO (mm) EM PÊSSEGOS DA CULTIVAR RUBIMEL AVALIADO NO 4º DIA APÓS INOCULAÇÃO COM <i>Monilinia fructicola</i> .....	82
<b>TABELA 15</b> - PERÍODO DE INCUBAÇÃO E LATÊNCIA (PI E PL) E ESTIMATIVA DE RISCO PARA A EXPRESSÃO DOS SINTOMAS E SINAIS DE <i>Monilinia fructicola</i> EM FRUTOS TRATADOS COM FUNGICIDA .	85
<b>TABELA 16</b> - CRESCIMENTO MICELIAL (mm) E PERCENTAGEM DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL (%ICM) DOS FENÓTIPOS EXTREMAMENTE SENSÍVEIS (SS) DE <i>M. fructicola</i> NA DOSE DISCRIMINATÓRIA DE 5µL.mL <sup>-1</sup> DE IPRODIONA. ....	108
<b>TABELA 17</b> - PADRÃO DE RESISTÊNCIA DE ISOLADOS de <i>Monilinia fructicola</i> AOS INIBIDORES DA DESMETILAÇÃO C14 CLASSIFICADOS PELA DOSE DISCRIMINATÓRIA DE 0,3 µg. mL <sup>-1</sup> .....	111
<b>TABELA 18</b> - PADRÃO DE RESISTÊNCIA DE ISOLADOS DE <i>Monilinia fructicola</i> AOS INIBIDORES DA QUINONA EXTERNA CLASSIFICADOS PELAS DOSES DISCRIMINATÓRIAS DE 1,0 E 0,1 µg. mL <sup>-1</sup> .....	112
<b>TABELA 19</b> - PADRÃO DE RESISTÊNCIA DE ISOLADOS DE <i>Monilinia fructicola</i> AOS METIL BENZIMIDAZÓIS CARBAMATOS CLASSIFICADOS PELAS DOSES DISCRIMINATÓRIAS DE 1 e 500µg. mL <sup>-1</sup> .....	113

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>19</b>
2.1	O PESSEGUEIRO .....	19
2.2	PODRIDÃO- PARDA DO PESSEGUEIRO.....	21
2.3	CONTROLE QUÍMICO DA PODRIDÃO-PARDA DO PESSEGUEIRO .....	23
2.4	RESISTÊNCIA À FUNGICIDAS E ADAPTABILIDADE DE ISOLADOS RESISTENTES .....	25
2.4.1	Resistência de <i>M. fructicola</i> aos fungicidas Metil Benzimidazóis Carbamatos (MBC's).....	28
2.4.2	Resistência de <i>M. fructicola</i> as Dicarboximidas (DC's) .....	30
2.4.3	Resistência de <i>M. fructicola</i> aos Inibidores da Desmetilação C14 (IDM's)...	31
2.4.4	Resistência de <i>M. fructicola</i> aos Inibidores da Quinona Externa (IQe's).....	33
<b>3</b>	<b>CAPÍTULO I - ISOLADOS BRASILEIROS DE <i>Monilinia fructicola</i> NÃO APRESENTAM REDUÇÃO DE SENSIBILIDADE AO IPRODIONA .....</b>	<b>37</b>
3.1	INTRODUÇÃO.....	39
3.2	MATERIAL E MÉTODOS .....	41
3.2.1	Obtenção dos isolados .....	41
3.2.2	Avaliação da sensibilidade de <i>Monilinia fructicola</i> ao iprodiona .....	43
3.2.3	Eficiência de controle e incidência de <i>M. fructicola</i> em frutos tratados com iprodiona.....	44
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	46
3.4	CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES.....	52
	REFERÊNCIAS.....	53
<b>4</b>	<b>CAPÍTULO II - RESISTÊNCIA MÚLTIPLA DE <i>Monilinia fructicola</i> AOS IDM, IQE, E MBC E COMPARAÇÃO DOS FENÓTIPOS QUANTO AOS COMPONENTES DE ADAPTABILIDADE .....</b>	<b>58</b>
4.1	INTRODUÇÃO.....	60
4.2	MATERIAL E MÉTODOS .....	63
4.2.1	Obtenção dos isolados .....	63
4.2.2	Avaliação da sensibilidade <i>in vitro</i> de <i>M. fructicola</i> aos IDM's, IQe's, MBC's e classificação dos fenótipos de resistência.....	65



4.2.3	Determinação dos componentes de adaptabilidade ( <i>fitness</i> ) de diferentes fenótipos de <i>M. fructicola</i> .....	69
4.2.4	Avaliação da resistência prática de <i>M. fructicola</i> em frutos destacados tratados com fungicidas .....	71
4.2.5	Análise estatística .....	72
4.3	RESULTADOS .....	75
4.3.1	Avaliação da sensibilidade <i>in vitro</i> de <i>M. fructicola</i> aos IDM's, IQe's, MBC's e classificação dos fenótipos de resistência.....	75
4.3.2	Avaliação dos fenótipos quanto aos componentes de adaptabilidade.....	79
4.3.3	Caracterização da resistência prática de <i>M. fructicola</i> em frutos destacados	82
4.4	DISCUSSÃO .....	86
4.5	CONCLUSÕES.....	92
	REFERÊNCIAS .....	93
<b>5</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>98</b>
	<b>REFERÊNCIAS GERAIS .....</b>	<b>99</b>
	<b>APÊNDICE A .....</b>	<b>107</b>
	<b>APÊNDICE B .....</b>	<b>114</b>



## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A podridão-parda do pessegueiro é a doença de maior importância econômica em quase todas as regiões produtoras do mundo devido aos sérios prejuízos causados decorrentes da diminuição da capacidade produtiva do pomar e da sanidade dos frutos após sua colheita (CARVALHO; CHALFOUN, 1997). Causada pelo fungo *Monilinia fructicola* (G. Wint.) Honey, a podridão-parda é considerada a principal doença que afeta a cultura do pessegueiro no Brasil (MAY DE MIO et al., 2014).

O inóculo provindo de frutos mumificados infecta flores no início da primavera resultando em queima das flores e formação de cancrios nos ramos. Esporos produzidos nestas flores destruídas e nos cancrios infectam os frutos durante o período de amadurecimento e pré-colheita (WATSON; ZEHR; GRIMES, 2002).

O controle de *M. fructicola* envolve práticas culturais como a remoção de frutos mumificados e a poda dos ramos doentes, que começam no inverno e buscam reduzir a fonte do inóculo. No entanto, o controle químico é o método mais adotado e envolve aplicações de fungicidas realizadas desde a floração até a pré-colheita dos frutos (MOREIRA; MAY DE MIO, 2009; PAVANELLO et al., 2015).

Vários fungicidas tem sido utilizados para o controle da queima das flores, cancro nos ramos e podridões nos frutos causados por *M. fructicola*. Os fungicidas inclusos nos grupos Metil Benzimidazole Carbamates (MBC's), Dicarboximidas (DC's), Inibidores da Desmetilação C14 (IDM) e Inibidores da Quinona externa (IQe's) são utilizados em misturas ou rotações em pomares comerciais de pêssgo durante a safra (MAY DE MIO et al., 2004; YOSHIMURA et al., 2004; LICHTENBERG et al., 2016). No entanto, os níveis de controle utilizando esses fungicidas nem sempre tem sido satisfatórios, resultando em muitos casos, na falha de controle devido à seleção de isolados de *M. fructicola* resistentes ou com sensibilidade reduzida (LICHTENBERG et al., 2016).

Os fungicidas MBC's foram os primeiros fungicidas sistêmicos a serem lançados e foram amplamente utilizados para o controle de *M. fructicola* (MA; MICHAILIDES, 2003; MAY DE MIO; LUO; MICHAILIDES, 2011). Contudo, devido a ocorrência da resistência generalizada em diversos fungos fitopatogênicos, estes foram substituídos pelas DC's no final da década de 70 e pelos IDM's no início da década de 80 (NORTHOVER; MATTEONI, 1986; ELMER; GAUNT, 1993; CUI et al.,

2004; SONODA et al., 1982). Os IDM's então passaram a ser amplamente utilizado pelos produtores comerciais de frutas de caroço para controlar queima das pétalas e podridão-parda em frutos pré-colheita causada por diferentes espécies de *Monilinia* (HOLB, 2004). Recentemente, os produtores têm utilizado fungicidas IQe's alternados com os IDM's como parte do programa de manejo da doença (MAY DE MIO; LUO; MICHAILIDES, 2011).

No Brasil, já houve relatos da resistência de *M. fructicola* aos IDM's (LICHTENBERG et al., 2014, 2017), aos MBC's (MAY DE MIO; LUO; MICHAILIDES, 2011) e redução de sensibilidade aos IQe's (PEREIRA et al., 2017), contudo ainda não houveram estudos avaliando a sensibilidade de *M. fructicola* ao fungicida iprodiona.

Apesar de muitas pesquisas terem sido realizadas com resistência de *M. fructicola* a fungicidas (MA; LUO; MICHAILIDES, 2003,2006; AMIRI, BRANNEN E SCHNABEL, 2010; CHEN et al., 2017), ainda são escassos trabalhos sobre a interação de resistência que ocorre entre um ou mais produtos, necessitando-se a avaliação de resistência múltipla entre grupos químicos. Além disso, mutações que levam a resistência podem melhorar a capacidade do patógeno de sobreviver na presença dos fungicidas. Contudo, essas mutações podem comprometer a adaptabilidade, ou seja, comprometer a capacidade de infectar, reproduzir ou competir na presença de outros organismos (BRENT; HOLLOMON, 1998). Aplicações de fungicidas em uma população de fungos com alta resistência e boa adaptabilidade parasítica podem levar a falhas no controle (BRENT; HOLLOMON, 1998). Portanto, o conhecimento da resistência a mais de um fungicida, bem como a adaptabilidade dos isolados com múltipla resistência são informações essenciais para se estabelecer estratégias de manejo dessa doença.

Além disso, é importante se determinar a resistência prática dos isolados múltiplo resistentes aos fungicidas, pois nem sempre a detecção da resistência ou redução da sensibilidade de fungos à fungicidas observada em laboratório podem estar relacionada com as falhas de controle no campo. A “resistência pratica” é um termo utilizado para expressar a observável perda de controle da doença nas condições de campo (GHINI; KIMATI, 2000; BRENT; HOLLOMON, 2007) e pode ser confirmada em plantas ou em frutos tratados com a concentração do fungicida recomendada para o produtor.

Nesse contexto, os objetivos desse trabalho foram: (a) investigar a sensibilidade dos isolados de *M. fructicola* ao iprodiona, (b) verificar a ocorrência da resistência múltipla de *M. fructicola* aos fungicidas IDM's, MBC's e IQe's, avaliando a adaptabilidade dos fenótipos encontrados e (c) avaliar a ocorrência da resistência prática em frutos tratados com os fungicidas.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 O PESSEGUEIRO

O pessegueiro é uma planta arbórea nativa da China pertencente à família Rosaceae, subfamília Prunoidea, Gênero *Prunus* e espécie *Prunus persica* (L.) Batsch (FRANZON; RASEIRA, 2014).

Como característica morfológica, essa espécie possui raízes pivotantes e tronco e ramos com coloração acinzentada contornado por lenticelas (CASTRO; BARBIERI, 2014). Os ramos podem ser classificados de acordo com a distribuição das gemas de flor em mistos (portadores de gemas vegetativas e floríferas), brindilos (portam predominantemente gemas floríferas), dardos (ramos curtos com gema florífera) ou ladrões (ramos vigorosos que crescem na posição vertical e emitem numerosos ramos antecipados) (RASEIRA; QUEZADA, 2003).

As folhas são oblongas, lanceoladas com distribuição alternadas e as flores são perfeitas, completas e períginas (CASTRO; BARBIERI, 2014). O fruto é uma drupa carnosa, com pericarpo fino, mesocarpo polposo, endocarpo lenhoso e possui uma epiderme aveludada recoberta por tricomas (SACHS; CAMPOS, 1998).

Por ser uma espécie caducifólia, o pessegueiro entra em repouso vegetativo no período de inverno em que ocorre a queda das folhas, estratégia para resistir às condições das baixas temperaturas (HERTER et al., 1998).

A totalidade dos cultivares de pessegueiro apresentam-se dentro de três variedades botânicas: *vulgaris* - frutos com epiderme pilosa, polpa branca ou amarela, podem ser do tipo solta-carão ou carão preso, e servir para conserva, consumo in natura ou dupla finalidade; *nurcipersica* - possui frutos de forma globosa, colorido e epiderme lisa e são denominados nectarinas; *platycarpa* - produz frutos com forma achatada do sentido da base para o ápice com epiderme pilosa, sendo cultivados em pequena escala (SACHS; CAMPOS, 1998).

Os pêssegos juntamente com as nectarinas estão entre as 20 frutas mais produzidas mundialmente, ocupando o 12º lugar (STATISTA, 2014). A China ocupou em 2016 o primeiro lugar no *ranking* mundial, detendo mais de 60% da produção de pêssegos e nectarinas, seguida da Espanha (6,54%), Itália (6,11%) e Estados Unidos

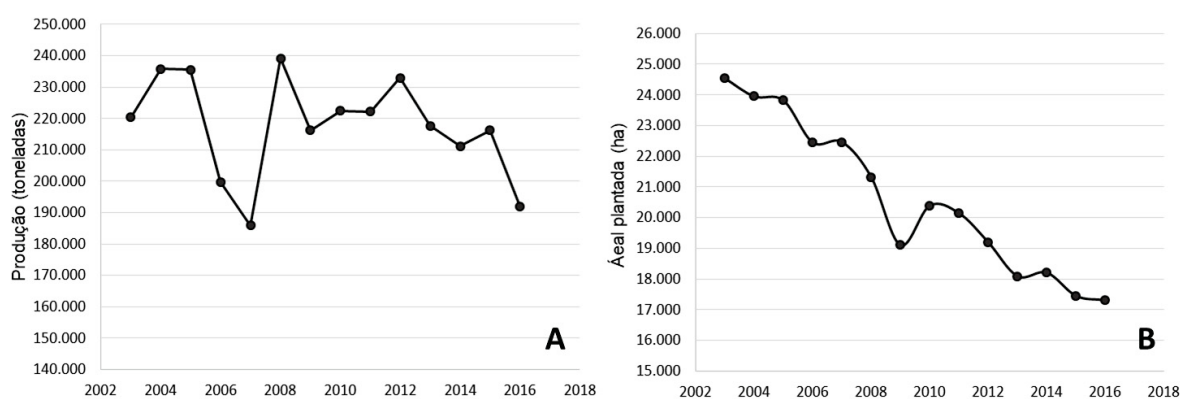
(3,97%). Nesse mesmo ranking, o Brasil ocupou a 15ª colocação com produção estimada de 191.855 toneladas (0,82%). Na América do Sul, os países que se destacam são o Chile e Argentina com, respectivamente, 1,44% e 1,06% da produção mundial (FAO, 2018).

A maior parte da produção de pêssego brasileira é consumida no mercado interno, entretanto o país complementa a demanda com importações de países como o Chile, Argentina, Espanha e Estados Unidos (MONTEIRO; JULIÃO, 2013).

O pessegueiro foi introduzido em 1532 no Brasil, sendo que o maior impulso na indústria de processamento de pêssego ocorreu na década de 1960 (FRANZON; RASEIRA, 2014). Os principais estados produtores de pêssego no país são Rio Grande do Sul, detendo mais de 60% da produção brasileira, seguidos de São Paulo (17%), Minas Gerais (8%), Santa Catarina (8%) e Paraná (6%) (IBGE, 2017). Embora o Rio Grande do Sul apresente uma maior produção de pêssegos, as maiores produtividades foram encontradas nos estados de Minas Gerais (26 t/ha), São Paulo (19,26 t/ha) e Paraná (10,05 t/ha) (AGRIANUAL, 2009). Esse fato provavelmente está relacionado aos diferentes níveis tecnológicos empregados nessas regiões.

A produção brasileira de pêssegos em 2016 foi estimada em 191.855 toneladas num total de 17.309 hectares ocupados com a cultura (IBGE, 2018). A área plantada no país tem decaído nas última décadas (FIGURA 1B), entretanto a produção não acompanhou essa queda, sendo heterogênea ao longo dos anos. Isso, principalmente em função das variações das condições climáticas nas regiões produtoras, problemas fitossanitários e também devido ao uso de diferentes tecnologias pelos produtores.

**FIGURA 1-** PRODUÇÃO DE PÊSSEGOS (A) E TOTAL DE ÁREA PLANTADA COM PESSEGUEIRO NO BRASIL (B).



FONTE: IBGE (2017)

No Paraná, o cultivo do pessegueiro ocupou em 2016 uma área de 1.003 hectares com uma produção de 11.323 toneladas (IBGE, 2017). Os primeiros registros do cultivo comercial de fruteiras de caroço no estado do Paraná foram na década de 1960 na região metropolitana de Curitiba, embora foi a partir da década de 1970, que notavelmente o pessegueiro se estabeleceu como atividade econômica no estado (CITADIN, 2009).

## 2.2 PODRIDÃO- PARDA DO PESSEGUEIRO

A podridão-parda é a principal doença das frutas de caroço que ocorre em quase todos os pomares e em diversas fases do ciclo da cultura (MOREIRA; MAY DE MIO, 2009). Esta doença pode ser causada por três espécies mais frequentes de fungos da ordem Helotiales, gênero *Monilinia*, sendo elas: *M. fructicola* (G. Winter) Honey, *M. laxa* (Aderhold & Ruhland) Honey e *M. fructigena* (Aderh. & Ruhl.) Honey (BLEICHER, 1997). A *M. fructigena* é endêmica na Europa e foi eliminada da América do Norte (OGAWA et al., 1995) região onde *M. fructicola* ocorre abundantemente. Na década de 90 na Europa, *M. laxa* era o patógeno responsável por elevadas perdas na produção (OGAWA et al., 1995). Até 2006 na Espanha, 85-90% da podridão-parda era causada por *M. laxa* e 10-15% por *M. fructigena*. Contudo, após sua detecção, *M. fructicola* se disseminou em diversas regiões da Espanha, ocorrendo atualmente numa mesma frequência que *M. laxa* (EGUEN; MELGAREJO; DE CAL, 2015).

Para *M. fructicola*, são descritas as seguintes sinonímias: *Ciboria fructicola* G. Winter, *Monilia fructicola* L.R. Batra, *Sclerotinia americana* (Wormald) Norton & Ezekiel, *Sclerotinia cinerea* f. *americana* Wormald e *Sclerotinia fructicola* (G. Winter) Rehm (INDEX FUNGORUM, 2017).

No Brasil, a podridão-parda é a doença de maior importância que afeta a cultura do pessegueiro (OGAWA et al., 1995; FORTES; MARTINS, 1998; MAY DE MIO et al., 2014). Embora *M. fructicola* seja considerada a principal espécie causadora da doença, já foi relatada a presença de *Monilinia laxa* em frutos infectados no estado de São Paulo (SOUZA et al., 2008). Além do pêssego, o patógeno pode infectar diversas rosáceas como ameixa, cereja, nectarina, damasco, maçã e pêra (BYRDE; WILLETTS, 1977)



O patógeno ataca ramos, flores e principalmente os frutos, tendo início na primavera, em que infecta os órgãos florais (MAY DE MIO et al., 2008). A partir da flor, o patógeno avança pelo estigma até chegar no ovário, podendo alcançar o pedúnculo e penetrar no ramo. As flores infectadas murcham e tornam-se marrons, causando queima e queda de pétalas. Quando o patógeno alcança os ramos, há o desenvolvimento de cancos, onde ocorre o anelamento e a morte da parte terminal (MAY DE MIO et al., 2014).

Flores que sobrevivem à infecção, podem gerar frutos imaturos contendo o patógeno que sob condições desfavoráveis, permanecem latentes ocasionando podridão nas fases de pré e pós-colheita. As infecções também podem ocorrer nos frutos a partir da penetração do fungo diretamente pela cutícula ou através de feridas, sendo que a colonização do fruto maduro ocorre rapidamente a partir da formação de micélio inter e intracelular (BLEICHER, 1997). Ferimentos causados por insetos, por granizo ou pela manipulação do fruto na colheita e pós-colheita facilitam a penetração e infecção do patógeno (OGAWA et al., 1995).

Os frutos infectados apresentam o desenvolvimento de lesões pequenas e pardacentas, com aspecto encharcado que evoluem para manchas marrons (MAY DE MIO et al., 2014). Essas manchas podem ficar recobertas por esporos acinzentados, acarretando posteriormente na desidratação e mumificação dos frutos, onde estes podem permanecer presos na planta ou caídos no solo (MAY DE MIO et al., 2014; AGRIOS, 2005; OGAWA et al., 1995). Os conídios produzidos nas lesões podem ser disseminados pelo vento, água e insetos, podendo infectar outras flores e frutos jovens (BLEICHER, 1997). Os sintomas em flores, ramos e frutos estão ilustrados na FIGURA 2.

**FIGURA 2-** PODRIDÃO (A), MUMIFICAÇÃO DOS FRUTOS (B) CANCRO NOS RAMOS E QUEIMA DAS PÉTALAS (C) OCOSIONADOS POR *M. fructicola* EM PESSEGUEIRO



As epidemias de podridão-parda ocorrem em condições de umidade relativa superior a 85%, sendo a temperatura ótima de 25°C para o crescimento micelial e para produção e germinação de conídios. Necessita-se de um período mínimo de 18 horas a 10°C e de 5 horas a 25°C para ocorrência de infecção (BLEICHER, 1997), onde após 48 horas é possível visualizar os sintomas da doença (OGAWA et al., 1995). Em alguns casos, a incidência em frutos podem chegar até 100% quando em condições ambientais favoráveis ao patógeno (MAY DE MIO et al., 2014).

A sobrevivência do fungo de uma safra para outra ocorre nas múmias, pedúnculos remanescentes, flores murchas em ramos e cancos (MAY DE MIO et al., 2014). Assim permanecem ou sobrevivem por todo o inverno, e na primavera seguinte, em condições favoráveis, liberam conídios, que constituem então, o inóculo primário da doença (BLEICHER, 1997).

Este fungo produz escleródios bem desenvolvidos que ao germinarem formam apotécios onde são produzidos os ascos. Por meio desta estrutura, os ascósporos são projetados e disseminados pelo vento, constituindo-se no inóculo primário da doença nas localidades onde são produzidos (AGRIOS, 2005). No entanto, nas condições brasileiras, a ocorrência da fase perfeita é rara, sendo o inóculo primário constituído basicamente de conídios formados em cancos de ramos e frutos. A formação do apotécio é lenta e requer temperaturas baixas e umidade elevada (SOUZA, 2006).

Embora práticas de saneamento, tais como podas, remoções de múmias e de frutos contaminados são amplamente implementadas, o controle baseado na aplicações de fungicidas tem sido o mais frequentemente empregado para o manejo da doença.

## 2.3 CONTROLE QUÍMICO DA PODRIDÃO-PARDA DO PESSEGUEIRO

O controle químico é o método mais adotado para o controle da podridão-parda sendo o tratamento feito com pulverizações que se estendem desde a floração à pré-colheita dos frutos (MOREIRA; MAY DE MIO, 2009). É imprescindível que a



aplicação de fungicida se inicie na fase da floração pois essa fase é extremamente suscetível à infecção do patógeno (OGAWA et al., 1995).

O número de tratamentos dependerá das condições climáticas favoráveis ao patógeno, da duração do período de floração e do estado fitossanitário do pomar (BLEICHER, 1997; FORTES; MARTINS, 1998). O número de pulverizações com fungicidas pode chegar a 8 aplicações no Rio Grande do Sul (TIBOLA et al., 2005), 10 no Paraná (MAY DE MIO et al., 2008) e até 15 em São Paulo (MAY DE MIO et al., 2011). Em áreas com histórico de alta pressão de inóculo, o controle químico deve ser feito o mais precocemente possível, sendo recomendada a primeira pulverização quando a sépalas se tornam visíveis, e as demais aplicações na plena floração e na queda das pétalas (KIMATI et al., 1997; FORTES; MARTINS, 1998). O controle de insetos faz-se necessário junto com a aplicação dos fungicidas, pois tem a finalidade de diminuir a quantidade de ferimentos nos frutos (BLEICHER, 1997; AGRIOS, 2005).

Os fungicidas foram utilizados pela primeira vez para o controle de *Monilinia* spp. quando os produtos à base de cobre foram introduzidos no início e meados da década de 1920. A calda bordalesa e substâncias similares foram aplicadas em tratamentos de inverno, reduzindo significativamente o potencial de sobrevivência do patógeno (HOLB; SCHNABEL, 2005).

No Brasil, os fungicidas registrados para a cultura do pessegueiro estão inseridos em diversos grupos químicos, dentre eles:

IQe - “Inibidores da Quinona Externa” que compreendem as estrobilurinas (azoxistrobina e piraclostobina); IDM- “Inibidores da Desmetilação C14” com o grupo dos triazóis e análogos (ciproconazole, difenoconazol, fluquinconazole e tebuconazol); DC- “Dicarboximidas” (iprodiona, procimidona); fenilpiridinilamida (fluazinam); guanidinas (dodina), hidrocarbonetos aromáticos (diclorana), inorgânicos (enxofre e cúpricos) e os fungicidas multi-sítios dos grupos ftalimidas (captana), ditiocarbamatos (mancozebe) e quinonas (ditiocarbamatos) (AGROFIT, 2018).

Produtos contendo azoxistrobina e piraclostobina são recomendados para a cultura do pessegueiro para o controle de ferrugem (*Tranzschelia discolor*), no entanto, os produtores costumam utilizar esse ingrediente ativo para prevenir também a podridão-parda (LICHTENBERG et al., 2016). Em São Paulo são aplicados triazóis em alternância com estrobilurinas nos programas de pulverizações para controle da doença (MAY DE MIO LUO; MICHAILIDES, 2011). Outros produtores utilizam

produtos com iprodiona, procimidone e tiofanato-metílico pelo menos duas vezes durante a mesma safra (MAY DE MIO; LUO; MICHAILIDES, 2011).

Devido a um único mecanismo de ação dos fungicidas sistêmicos, populações de *M. fructicola* têm desenvolvido resistência à esses produtos e isso tornou-se evidente a partir de 1960 com o lançamento desses fungicidas no mercado (BRENT; HOLLOMON, 2007). A combinação de fungicidas sítio-específicos com os de largo espectro tem sido utilizada para minimizar esse problema (AGRIOS, 2005).

O Comitê de Ação de Resistência a Fungicidas (FRAC) tem classificado *Monilinia* spp. como patógeno com risco de resistência moderado. A reprodução sexual pode aumentar o potencial evolutivo através do cruzamento e da geração de novas combinações genotípicas enquanto a reprodução assexuada contribui para a rápida disseminação de indivíduos resistentes em uma população de fungos (EGUEN; MELGAREJO; DE CAL, 2016).

## 2.4 RESISTÊNCIA À FUNGICIDAS E ADAPTABILIDADE DE ISOLADOS RESISTENTES

A resistência é uma característica ou uma alteração herdável e estável de um fungo em resposta a aplicação de um fungicida, resultando na redução da sensibilidade do fungo ao produto (MA; MICHAILIDES, 2005). A resistência a fungicidas pode ser chamada de "resistência adquirida" pois populações resistentes de um patógeno alvo pode surgir geralmente como uma resposta devido ao uso repetido de um fungicida (BRENT; HOLLOMON, 2007).

Isolados ou populações de fungos com sensibilidade consideravelmente menor que a *baseline* são normalmente considerados "menos sensíveis" ou "resistentes" ao fungicida. A *baseline* representa a variação da sensibilidade natural ou inicial em populações de patógenos antes de serem expostos a determinado fungicida. A *baseline* é uma ferramenta útil para a interpretação de quaisquer dados de monitoramento posteriores em termos de possíveis mudanças na sensibilidade (RUSSEL, 2002; BRENT; HOLLOMON, 2007). O termo "*redução da sensibilidade*" é muito utilizado nesse caso, quando o mecanismo da resistência permanece indefinido.

Geralmente, fungos resistentes à fungicidas originam-se por meio de mutação, na qual a frequência em que essa ocorre depende do grupo químico do fungicida em questão (BERGAMIN FILHO; AMORIM, 2001). Existem vários mecanismos genéticos e bioquímicos, que podem levar ao surgimento de resistência dos fungos aos fungicidas. Dentre eles a alteração do sítio alvo devido à mutação no gene que o codifica; a redução da absorção ou aumento do efluxo do produto; a detoxificação da molécula; a falta de conversão para o composto ativo; a compensação por meio do aumento da produção da enzima alvo; o desenvolvimento de vias metabólicas alternativas que não incluem o sítio alvo do fungicida, dentre outros (LEROUX et al., 2002).

A resistência pode ocorrer devido à mutação em um único gene ou pode ocorrer devido a mutações em vários genes. As mutações de um único gene que conferem resistência aos fungicidas de sítio-específico são mais propensas a se desenvolverem do que a ocorrência de mutações em vários genes conferidas pela resistência a fungicidas multi-sítios (DAMICONE; SMITH, 2009).

A seleção de fungos resistentes à fungicidas depende de fatores como a frequência de aplicação, o modo de ação do ingrediente ativo, a taxa de mutações dentro de uma população de patógeno, taxa de reprodução e adaptabilidade dos patógenos que tenham uma resistência adquirida (ANDERSON, 2005).

A frequência de indivíduos resistentes encontrados em campo pode aumentar devido à pressão de seleção exercida pelo uso de fungicidas. O fungicida inibe seletivamente patógenos sensíveis, permitindo o aumento dos indivíduos resistentes. Esta mudança na sensibilidade pode correr em níveis diferentes, dependendo do número de genes envolvidos. Quando as mutações são situadas em um único gene, ocorre uma brusca mudança na resistência que conduz a uma população de patógenos predominantemente resistente a fungicidas, resultando dessa maneira, em uma falha total no controle da doença. Nesse caso refere-se que a resistência é do tipo “qualitativa”. Quando vários genes estão envolvidos, a mudança em direção da resistência progride lentamente e de forma gradual caracterizando um caso de resistência “quantitativa”. A mudança gradual dos múltiplos genes pode resultar em redução da eficiência do fungicida, mais não a perda total do controle (DAMICONE; SMITH, 2009; GHINI; KIMATI, 2000).

Populações patogênicas podem desenvolver resistência a um fungicida e automaticamente tornarem-se resistentes a outros fungicidas que são afetados pela

mesma mutação no gene e com o mesmo mecanismo de ação. Este fenômeno é conhecido como "resistência cruzada". Porém, alguns patógenos ainda podem desenvolver resistência a dois ou mais fungicidas não relacionados e com diferentes mecanismos de ação. Estes resultam de mutações independentes que são selecionados pela exposição a cada um dos fungicidas. Este fenômeno é totalmente diferente de resistência cruzada e é usualmente denominado de "resistência múltipla" (BRENT; HOLLOMON, 2007).

O nível de sensibilidade a um fungicida pode ser medido em laboratório pela exposição de um fungicida a uma coleção de isolados coletados em campo. A resposta de toxicidade ao fungicida pode ser medida através da inibição crescimento micelial dos fungos e/ou germinação de esporos. Para isso, a concentração efetiva que inibe o crescimento e a germinação em 50% ( $EC_{50}$ ) é então calculada para cada indivíduo amostrado (DAMICONE; SMITH, 2009). O método da dose discriminatória também pode ser utilizado para avaliação da sensibilidade a um fungicida. Este método inclui o uso de uma única dose que permite distinguir se um isolado é resistente ou sensível a um determinado produto (RUSSELL, 2004).

As doses discriminatórias podem ser estabelecidas em laboratório pela exposição da população fúngica a diferentes concentrações de um fungicida. Normalmente um isolado pode ser definido como resistente, quando este, na presença do fungicida, tiver crescimento ou germinação de esporos igual ou superior a 50% em relação à condição expressa na ausência do fungicida (RUSSELL, 2004). Depois de estabelecida a metodologia, estas podem ser reproduzidas futuramente em outros ensaios para um mesmo patossistema. As doses discriminatórias são ferramenta úteis para triagem inicial de isolados resistentes pois exigem menos tempo e material (LICHTENBERG et al, 2016).

Além dos experimentos *in vitro*, a confirmação da resistência prática pode ser realizada em plantas ou em frutos tratados com a concentração do fungicida recomendada para o produtor. O termo "resistência de campo" tem sido utilizado para indicar a presença de isolados resistentes em populações de campo e "resistência prática" para indicar conseqüentemente, a observável perda de controle da doença. A terminologia "Resistência de Laboratório" ou Resistência induzida artificialmente" também é utilizada na detecção de isolados resistentes em condições laboratoriais (GHINI; KIMATI, 2000; BRENT; HOLLOMON, 2007).

As mutações de resistência aos fungicidas podem reduzir a eficiência de importantes processos fisiológicos e bioquímicos do patógeno, levando a uma menor adaptabilidade. Ou seja, quando uma mutação que confere resistência aos fungicidas está relacionado com a perda de eficiência de algum mecanismo fisiológico, assume-se que a resistência acarreta custos ou penalidades adaptativas ao patógeno. A adaptabilidade parasitária e saprofítica de um fungo pode, portanto, ser definido como o sucesso da sobrevivência e a reprodução de um alelo, indivíduo ou grupo (GHINI; KIMATI, 2000; PRINGLE; TAYLOR, 2002).

Em populações fúngicas, a evolução da resistência a fungicidas depende em grande parte da adaptabilidade, que podem influenciar a dinâmica da competição entre isolados resistentes ou sensíveis a fungicidas (DEKKER, 1982). A adaptabilidade dos fitopatógenos pode ser composta por vários componentes que correspondem a diferentes estágios do ciclo de vida dos agentes patogênicos. Estes incluem: produção de esporos, dispersão de esporos, eficiência de infecção, crescimento micelial e a capacidade de sobreviver entre estações de cultivo (MIKABERIDZE; MCDONALD, 2015).

O conhecimento da adaptabilidade dos patógenos na ausência do fungicida tem importantes implicações para o manejo da doença (PARNELL; GILLIGAN; VAN DEN BOSCH, 2005). A frequência da resistência pode ser diminuída se os isolados resistentes tiverem menor adaptabilidade parasitária ou saprofítica. Em contraste, a ausência de custo de adaptabilidade na população resistente pode levar a frequências estáveis de resistência na ausência da pressão do fungicida ou ao rápido desenvolvimento e evolução da resistência na presença do fungicida (KARAOGLANIDIS; LUO; MICHAILIDES, 2011). Estudos mostraram que a ausência ou presença do custo adaptativo associada à resistência ao fungicida depende da espécie de fungo e da classe de fungicidas (COX, BRYSON; SCHNABEL, 2007; MA; MICHAILIDES, 2004).

#### 2.4.1 Resistência de *M. fructicola* aos fungicidas Metil Benzimidazóis Carbamatos (MBC's)

Os MBC's são constituídos por fungicidas do grupo químico dos benzimidazóis (benomil, carbendazim, fluberidazol, thiabendazol) e tiofanato

(tiofanato-metílico) (FRAC, 2018). Esses fungicidas atuam inibindo o desenvolvimento do tubo germinativo, a formação do apressório e o crescimento micelial (EHR & KEMMITT, 2002). Os fungicidas MBC's foram utilizados para controlar a podridão-parda por mais de 30 anos. Em 1992, o benomil foi retirado do mercado no Brasil, sendo assim, os produtores passaram a utilizar o tiofanato-metílico como MBC alternativo para o controle da podridão-parda em frutos de caroço (MAY DE MIO et al., 2011). O tiofanato-metílico é considerado um fungicida sistêmico de amplo espectro com ação preventiva e curativa (AGRIOS, 2005).

Os fungicidas MBC's são altamente seletivos e apresentam alta afinidade pelas proteínas tubulinas ( $\alpha$ - e  $\beta$ -tubulina), onde estas apresentam papel importante na divisão celular (RODRIGUES, 2006). Dessa forma, os MBC's agem ligando-se a essas proteínas impedindo a formação dos microtúbulos e consequentemente a divisão mitótica da célula (FRAC, 2015; RODRIGUES, 2006).

A resistência aos benzimidazóis tem sido detectada em muitas espécies de fungos, e na maioria dos casos a resistência correlacionou-se com mutações no gene da  $\beta$ -tubulina, na qual resulta em uma alteração na sequência de aminoácidos no sítio de ligação (MA; MICHAILIDES, 2005). Essas mutações em diferentes códons no gene da  $\beta$ -tubulina podem levar a diferentes níveis de resistência. Mutações no códon 6, 198 e 83 já foram relatadas em isolados de *M. fructicola* resistentes aos MBC's (MA et al., 2003; LIM et al. 2006; MARTINI et al., 2016). As mutações dos códons 6 e 198 foram relacionadas aos padrões de baixa resistência (LR) e alta resistência (HR), respectivamente (MA et al., 2003). Em *M. laxa*, a mutação no códon 240 foi associada ao padrão LR (MA et al., 2005).

Isolados de *M. fructicola* resistentes aos MBC's foram encontrados em diversos países, como Austrália (PENROSE, 1990), Nova Zelândia (ELMER; GAUNT, 1994; SANOAMUANG; GAUNT 1995), EUA (MA et al., 2003; LIM et al., 2006; ZHU et al., 2010), Brasil (MAY DE MIO et al. 2011) e Itália (MARTINI et al., 2016). No Brasil, diferentes padrões de resistência ao tiofanato metílico foram encontrados em isolados de *M. fructicola* coletados entre os anos de 2000 à 2008 (MAY DE MIO et al., 2011).

O desenvolvimento de resistência dos fungos aos benzimidazóis ocorre rapidamente e patógenos resistentes não podem ser controlados através do aumento das doses de aplicação ou pelo encurtamento do intervalo de pulverização. Os indivíduos resistentes competem com os sensíveis na natureza, mesmo sem pressão de seleção (BEEVER et al., 1983; ELMER; GAUNT, 1993; DAMICONE; SMITH, 2009).



Isso porque mutações que conferem resistência aos benzimidazóis não parecem conferir qualquer perda associada de adaptabilidade no campo (BEEVER et al., 1983). Portanto, uma população resistente permanecerá resistente mesmo sem a aplicação do fungicida. Também há forte evidência de que a resistência cruzada existe dentro deste grupo de fungicida (DAMICONE; SMITH, 2009).

Os fungicidas tiofanato-metílico e benomil foram amplamente utilizados para o controle de *M. fructicola* na Califórnia (MA; MICHAILIDES, 2003). Porém, com a retirada de benomil do mercado, a tendência foi de aumentar a utilização do tiofanato-metílico pelos produtores, agravando os casos de resistência aos MBC's (MAY DE MIO; LUO; MICHAILIDES, 2011). Entretanto, os benzimidazóis foram substituídos pelas dicarboximidas no final de 1970 em muitos programas de pulverização (NORTHOVER; MATTEONI, 1986; ELMER; GAUNT, 1993; CUI et al., 2004).

#### 2.4.2 Resistência de *M. fructicola* as Dicarboximidas (DC's)

Fungicidas desta classe (iprodiona, vinclozolina e procimidona) têm sido usados desde meados da década de 1970, principalmente para controlar fungos dos gêneros relacionados *Botrytis*, *Sclerotinia* e *Monilinia* (BRENT; HOLLOMON, 2007). O iprodiona é um fungicida pertencente à dicarboximidas que atua inibindo a germinação dos esporos e crescimento micelial, tendo principalmente ação preventiva. Esse fungicida foi usado para o controle da podridão-parda por mais de três décadas nos Estados Unidos onde não foi relatado nenhum caso de resistência (MA; MICHAILIDES, 2005). No entanto foi detectada a redução da sensibilidade a esse ingrediente ativo em *M. fructicola* em pomares da Nova Zelândia (ELMER; GAUNT, 1993; ELMER et al., 1998), da Coréia do Sul (HEON et al., 1998) e da Espanha (EGÜEN et al., 2015).

Para *Botrytis cinerea*, a resistência às dicarboximidas foi detectada no mundo todo, o que acarretou na redução da utilização desse composto para o controle do mofo cinzento (MA; LUO; MICHAILIDES, 2007). Embora esse grupo de fungicida tenha sido utilizado por muitos anos, seu mecanismo de ação ainda não é totalmente conhecido. Alguns estudos indicam que as dicarboximidas podem interferir na transdução do sinal osmótico (OSHIMA et al., 2006; MA; LUO; MICHAILIDES, 2006).

Além disso, observações de campo sugerem que a resistência às dicarboximidas não ocorre tão facilmente sob condições naturais como ocorre em laboratório (POMMER; LORENZ, 1982).

A análise genética de isolados de campo e laboratório resistentes as dicarboximidas em *Botrytis cinerea* demonstraram que a resistência é geralmente conferida por um único gene, o gene Daf1 (FARETRA; POLLASTRO, 1991). O Daf1 foi recentemente confirmado ser um sinônimo de dois componentes histidina quinase (BcOS1) que contém cerca de seis repetições de 90 aminoácidos seguido por um domínio quinase (MA; LUO; MICHAILIDES, 2007). Os dois componentes de histidina quinase (HK) são sensores que mediam diversas respostas e estão envolvidos em várias funções, tais como: transporte de metabolitos, osmorregulação, quimiotaxia e patogenicidade (WEST; STOCK, 2001). Os dois componentes HK são o principal regulador de funções celulares e estímulo nas bactérias em resposta ao meio ambiente. As HK possuem várias células que funcionam também em células eucarióticas, incluindo leveduras, fungos, e plantas de lodo (WEST; STOCK, 2001). Oshima et al. (2002) detectaram em todos isolados resistentes analisados de *B. cinerea* uma substituição do aminoácido isoleucina para serina no códon 86 (I86S) na segunda unidade de seis repetições do gene BcOS1, sugerindo dessa forma que essa mutação está associada à resistência às dicarboximidas.

As populações resistentes às dicarboximidas possuem normalmente genótipos de baixa resistência em condições de campo (BEEVER et al., 1983) e podem mostrar reduzida patogenicidade, de modo que, estas não competem com as populações sensíveis (POMMER; LORENZ, 1982; ELMER; GAUNT, 1993; RITCHIE, 1983). Dessa forma, a maior parte dos isolados resistentes tendem a se tornar sensível novamente, caso estes não forem submetidos constantemente à fungicidas desse grupo químico (POMMER; LORENZ, 1982; DAMICONE; SMITH, 2009).

#### 2.4.3 Resistência de *M. fructicola* aos Inibidores da Desmetilação C14 (IDM's)

Os fungicidas inibidores da Desmetilação, como os triazóis (tebuconazol, difenoconazol, propiconazol, ciproconazol) e análogos (triforine, protioconazol)



compreendem um grande número de fungicidas comercialmente bem sucedidos e foram os primeiros utilizados na agricultura na década de 1970 (MA E MICHAILIDES, 2005). No entanto, desde a década de 1980 foram verificados problemas de resistência em diversos fungos fitopatogênicos à esse grupo de fungicida (WYAND; BROWN, 2005; LUO; SCHNABEL, 2008b; NIKOU et al., 2009; LEROUX; WALKER, 2011), inclusive em *Monilinia spp.* A redução da sensibilidade ou resistência de *M. fructicola* aos IDM já foi detectada em pomares comerciais de fruteiras de caroço em diversas regiões dos Estados Unidos (SCHNABEL et al., 2004; LUO; SCHNABEL, 2008b; PARKER et al., 2006; CHEN; LIU; SCHNABEL, 2013) e no Brasil (MAY DE MIO et al., 2011; LICHTENBERG et al., 2017). O tebuconazol é o IDM mais utilizado para controlar a podridão-parda no Brasil (SILVA et al., 2011). Consequentemente, a seleção de isolados de *M. fructicola* resistentes ao tebuconazol ocorre principalmente nas regiões onde ocorrem aplicações frequentes desse fungicida (MAY DE MIO et al., 2011).

Vários mecanismos de resistência aos fungicidas IDM's foram descritos para diversos fungos fitopatogênicos, porém mutações no gene do citocromo P450 14 $\alpha$ -desmetilase (*CYP51*), que codifica para a enzima alvo dos fungicidas azóis são as mais comumente encontradas (LUO et al., 2008). Os IDM's agem inibindo a enzima 14 $\alpha$ -desmetilase (P450), que é importante na via da biossíntese de ergosterol (ZHU et al., 2012). Nos ascomicetos, o ergosterol é um importante componente estrutural das membranas celulares, e a sua deficiência leva a desintegração da membrana, ruptura e a perda de solutos iônicos (LUPETTI et al., 2002).

Em *Monilinia fructicola*, a resistência aos IDM's tem sido associada à elevada expressão do gene *MfCYP51* e a um correspondente elemento genético repetitivo denominado '*Mona*', inserido na região a montante do gene *MfCYP51* (LUO et al., 2008; VILLANI; COX, 2011). Contudo, no Brasil o elemento '*Mona*' não está relacionado aos isolados resistentes de *M. fructicola* ao fungicida tebuconazol (LICHTENBERG et al., 2017). Na China e no Brasil, isolados resistentes aos IDM's foram associados com mutações no gene *MfCYP51* nos códon 136 (mutação Y136F) e 461 (mutação G461S), respectivamente (CHEN et al., 2012; LICHTENBERG et al., 2017).

A resistência aos IDM's é denominada de resistência quantitativa ou contínua, porque ela se manifesta gradualmente, de forma parcial e variável em grau. A perda de eficiência a esses fungicidas geralmente não é completa e em alguns casos a

diminuição do desempenho do produto a campo pode ser superada pelo encurtamento dos intervalos entre os tratamentos ou por doses de aplicação um pouco mais elevadas (STAUB, 1991).

Muitos produtores de pêssego rotacionam fungicidas dos grupos IDM's e IQe's, porém, evidências sugerem que esta prática de manejo de resistência pode acelerar a seleção para resistência aos IQe's na presença de populações resistentes aos IDM (LUO; SCHNABEL, 2008a).

#### 2.4.4 Resistência de *M. fructicola* aos Inibidores da Quinona Externa (IQe's)

Fungicidas IQe (estrobilurinas) foram introduzidas no mercado em 1996. Comercializadas desde o final do século XX, as estrobilurinas passaram a ser conhecidas como fungicidas Inibidores da Quinona Externa (IQe), por terem como único modo de ação, a inibição da respiração mitocondrial, atuando no sítio Q<sub>o</sub> no citocromo b (PARREIRA; NEVES; ZAMBOLIM, 2009; FERNÁNDEZ-ORTUÑO et al., 2010). Os fungicidas IQe's, como azoxistrobina e a piraclostrobina foram originalmente desenvolvidos de derivados fungicidas naturais, tais como estrobilurina A e oudemansina A e são fortes inibidores da germinação de conídios e esporulação, tendo propriedades protetiva e curativa (BARTLETT et al., 2002).

A azoxistrobina pertence ao grupo das estrobilurinas, juntamente com outras moléculas, como piraclostrobina, picoxistrobina, trifloxistrobina e cresoxim-metilico. A toxicidade das estrobilurinas é proveniente da inibição da cadeia respiratória ao nível do Complexo III, impedindo a cadeia bioquímica de transferência de elétrons no sítio da mitocôndria, interferindo na respiração do patógeno (GHINI; KIMATI, 2000).

A atividade fúngica das estrobilurinas é através da inibição da respiração mitocondrial pela ligação no sítio Q<sub>o</sub> (sítio da quinona oxidase externa) do citocromo b. O citocromo b faz parte do complexo citocromo bc<sub>1</sub> (complexo III) localizado na membrana da mitocôndria de fungos e outros eucariotas. As estrobilurinas inibem a transferência de elétrons do citocromo b para o citocromo c<sub>1</sub>, o que leva a deficiência de energia na célula fúngica pela interrupção da formação de ATP (BARTLETT et al., 2002; FERNÁNDEZ-ORTUÑO et al., 2010).

Os fungicidas IQe's são eficazes na inibição da germinação dos esporos, micelial, crescimento micelial e esporulação dos agentes patogênicos (BARTLETT et al., 2002), mas é a etapa de germinação dos esporos o estágio de desenvolvimento do fungo com maior sensibilidade às estrobilurinas (OLIVER; HEWITT, 2014).

Por causa de sua atividade de amplo espectro de ação, as IQe's têm sido amplamente utilizadas na agricultura (BARTLETT et al., 2002). No entanto, o risco de desenvolvimento de resistência as IQe's é alto (FRAC, 2017).

Em *M. fructicola* já foi relatada uma mudança em direção à sensibilidade reduzida a azoxistrobina em isolados provindos dos Estados Unidos (AMIRI, BRANNEN; SCHNABEL, 2010) e Brasil (MAY DE MIO, LUO E MICHAILIDES, 2011; PEREIRA et al., 2017). A resistência a esses fungicidas também foi observada em diversos agentes patogênicos de diversas culturas, incluindo cereais (SIEROTZKI et al., 2000a; OLIVEIRA et al., 2015) e frutícolas (SIEROTZKI et al., 2000 b; STEINFELD et al., 2002). Na maioria dos casos, a resistência aos IQe's foi conferida por um ponto de mutação no gene mitocondrial do citocromo b (*cytb*) resultando em alterações na sequência de aminoácidos (MA; MICHAILIDES, 2005).

Para a maioria dos patógenos a resistência aos IQe tem sido relatada pela mutação que leva a substituição do aminoácido glicina por alanina na posição 143 (G143A) no citocromo b (*cyt b*) (BARTLETT et al., 2002), porém existem outras mutações: mudança da fenilalanina para leucina na posição 129 (F129L) (GISI et al., 2002) e substituição de glicina a arginina na posição 137 (G137R) (SIEROTZKI et al., 2007). Uma vez desenvolvida a mutação G143A, a resistência tende a ser estável, mesmo se o fungicida for usado de forma menos intensa. Este tipo de resistência é regulada por um gene principal, e uma mutação pontual que cause mudança em um único aminoácido da proteína alvo pode resultar em alto nível de resistência (BRENT; HOLLOMON, 2007).

Essa mutação não produz efeito negativo na atividade enzimática e, consequentemente, na adaptabilidade dos isolados (GISI et al., 2002). Porém, alguns patógenos inclusive *M. fructicola* podem, em alguns casos, possuir o íntron tipo I após o códon 143 no *cyt b* onde a substituição de nucleotídeo nesse códon impede que ocorra o *splicing* do íntron e consequentemente o processo de síntese de proteína, acarretando na letalidade do fungo (LUO et al., 2010).

Outras mutações na proteína alvo podem dar origem a menor níveis de resistência. Exemplo da mutação no F129L no citocromo b, que provoca apenas

baixos níveis de resistência em muitos patógenos, e, portanto, é de pouca importância prática, em contraste com a mutação G143A, que provoca um elevado grau de resistência (GISI et al, 2002).

## Capítulo I

### **ISOLADOS BRASILEIROS DE *Monilinia fructicola* NÃO APRESENTAM REDUÇÃO DE SENSIBILIDADE AO IPRODIONA**

### 3 CAPÍTULO I - ISOLADOS BRASILEIROS DE *Monilinia fructicola* NÃO APRESENTAM REDUÇÃO DE SENSIBILIDADE AO IPRODIONA

#### RESUMO

A podridão-parda, causada por *Monilinia fructicola* é responsável por perdas significativas na produção de pêssegos no Brasil. O controle dessa doença é realizado principalmente com aplicações preventivas de fungicidas que se estendem desde a floração até a pré-colheita dos frutos. As dicarboximidas (DC), tais como iprodiona, são amplamente utilizadas no manejo da doença por mais de três décadas no Brasil. Entretanto no Brasil, não há estudos sobre a sensibilidade de *M. fructicola* a este grupo químico. Além disso, poucas opções de produtos eficientes para o controle da podridão parda estão disponíveis para os produtores de frutas de caroço devido à presença de isolados brasileiros com sensibilidade reduzida a importantes grupos de fungicidas. Sendo assim, este trabalho objetivou estudar a sensibilidade de *M. fructicola* ao iprodiona e avaliar a eficiência desse produto no controle da podridão parda em frutos destacados. Avaliou-se 175 isolados oriundos dos estados de São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul, obtidos entre os anos de 2003 a 2017 a partir de dose discriminatória de 5 µg/mL de iprodiona. Os valores de EC<sub>50</sub> foram estimados para 18 isolados a partir da regressão linear entre a percentagem de inibição do crescimento micelial e do respectivo log<sub>10</sub> das concentrações do fungicida. A eficiência de controle da doença foi determinada no quinto dia após inoculação dos isolados de *M. fructicola* pela medição do diâmetro da lesão dos frutos tratados e não tratados com iprodiona. Contudo, não foram encontrados fenótipos resistentes na população de *M. fructicola* e 74% dos isolados estudados foram extremamente sensíveis ao iprodiona. A EC<sub>50</sub> dos isolados variou entre 0,11 a 1,05 µg/mL, confirmando a alta sensibilidade de *M. fructicola* a esse fungicida. A eficiência no controle da doença nos frutos com fermento foi maior que 85% e em frutos sem fermento foi 100%.

**Palavras-chave:** Pessegueiro; Podridão-parda; Dicarboximidas; Resistência a Fungicidas; Controle.

## CHAPTER I - BRAZILIAN ISOLATES OF *Monilinia fructicola* DO NOT SHOW REDUCED SENSITIVITY TO IPRODIONA FUNGICIDE

### ABSTRACT

Brown rot, caused by *Monilinia fructicola*, is responsible for significant losses to peach production in Brazil. The control of this disease is mainly performed with preventive applications of fungicides that extend from flowering to pre-harvest of the fruits. Dicarboximides (DC), such as iprodione, is a group that has been widely used in the management of the disease for more than three decades in the country. However, in Brazil there are no studies on the sensitivity of *M. fructicola* to this chemical group. In addition, few efficient products of brown rot control are available to stone fruit growers due to the presence of Brazilian isolates with reduced sensitivity to important groups of fungicides. Thus, this work aimed to study the sensitivity of *M. fructicola* to iprodione and to evaluate the efficiency of this product in the control of brown rot in detached fruits. We evaluated 172 isolates from the states of São Paulo, Paraná and Rio Grande do Sul collected between 2003 and 2017, by using the discriminatory dose of 5 µg/ml of iprodione. EC<sub>50</sub> values were estimated for 18 isolates from a linear regression between the percentage of growth inhibition and the respective log<sub>10</sub> of fungicide concentrations. Efficiency of disease control was determined five days after inoculation with *M. fructicola* isolates by measuring the lesion diameter of treated and not treated fruits with iprodione. However, no resistance phenotype was found in *M. fructicola* population and 74% of the isolates were extremely sensitive to iprodione. The EC<sub>50</sub> of the isolates ranged from 0.11 to 1.05 µg/ml, confirming the high sensitivity of *M. fructicola* to this fungicide. The disease control efficiency on injured fruits was greater than 85% and in non-injured fruits the control efficiency of 100% was observed.

**Key Words:** Peach; Brown rot; Dicarboximides; Fungicide Resistance; Control.

### 3.1 INTRODUÇÃO

A podridão-parda causada por *Monilinia fructicola* (Wint.) Honey é a doença mais destrutiva pré e pós-colheita na cultura do pessegueiro na maioria das regiões produtoras do Brasil (MOREIRA et al., 2002; MAY-DE MIO et al., 2014).

O controle químico é o método mais adotado no controle de *M. fructicola* (MOREIRA; MAY DE MIO, 2009; PAVANELLO et al., 2015), sendo realizado com aplicação de fungicidas desde a floração até a pré-colheita dos frutos. Grupos de fungicidas como as Dicarboximidas (DC's), Metil Benzimidazóis Carbamatos (MBC's), Inibidores de Desmetilação C14 (IDM's), e Inibidores da Quinona Externa (IQe's) são amplamente utilizados para controlar a podridão-parda (MAY DE MIO et al., 2004; LICHTENBERG et al., 2016).

Os MBC's foram os primeiros fungicidas sistêmicos a serem lançados no mercado na década de 1960 para controle de diversos patógenos de plantas. No entanto, após alguns anos foi observada falha no controle de diversas doenças devido a seleção de fungos resistentes a esse grupo (YOUNG, 2015). No final da década de 1970, as DC's (iprodiona, vinclozolin, e procimidone) passaram a ser utilizadas como alternativa aos MBC's, principalmente para controlar fungos dos gêneros *Botrytis*, *Sclerotinia* e *Monilinia* em diversas áreas (NORTHOVER; MATTEONI, 1986; ELMER; GAUNT, 1993; BRENT; HOLLOMON, 2007; CUI et al., 2004). Não surpreendentemente, a resistência de campo a DC's foi primeiramente observada em *Botrytis cinerea* na Alemanha e em *Sclerotinia minor* e *M. fructicola* nos Estados Unidos (HOLZ, 1979; PORTER; PHIPPS, 1985; PENROSE et al., 1985 *apud* SZTEJNBERG; JONES, 1978).

Isolados de *M. fructicola* resistentes ou com sensibilidade reduzida às DC's já foram encontrados em pomares na Nova Zelândia (ELMER; GAUNT, 1986, 1993), na Austrália (PENROSE; KOFFMANN; NICHOLLS, 1985; SANAMUANG; GAUNT, 1995), na Coreia do Sul (HEON et al., 1998), na Espanha (EGÜEN; MELGAREJO; DE CAL, 2015) e na Sérvia (HRUSTIĆ et al., 2017). Para *Botrytis cinerea*, a resistência às dicarboximidas foi detectada no mundo todo, o que acarretou a redução da utilização desse produto para o controle do mofo cinzento (MA; LUO; MICHAILIDES, 2007).



Na década de 1980, os IDM's passaram a ser amplamente utilizado pelos produtores como alternativa de controle de queima das pétalas e podridão-parda em frutos pré-colheita causada por diferentes espécies de *Monilinia* (HOLB, 2004). A partir de 2000, os fungicidas IQe's foram registrados para o pessegueiro e são recomendados como parte do programa de manejo da doença para uso em rotação com IDM's (MAY DE MIO; LUO; MICHAILIDES, 2011). Entretanto, a seleção de isolados de *M. fructicola* resistentes ou com sensibilidade reduzida aos IQe's, IDM's e MBC's tem ocorrido frequentemente no mundo (AMIRI, BRANNEN E SCHNABEL, 2010; VILLANI e COX, 2011; CHEN; LIU; SCHNABEL, 2013), inclusive no Brasil (MAY DE MIO; LUO; MICHAILIDES, 2011; LICHTENBERG et al., 2014, 2017; PEREIRA et al., 2017). Visto que esses três grupos de fungicidas são amplamente utilizados para o controle da podridão-parda, poucas alternativas de produtos considerados eficientes ficam disponíveis para a escolha do produtor. Frente a este problema, torna-se necessário o estabelecimento de opções de fungicidas que já são registrados para a cultura do pessegueiro e que atuem de forma eficiente, principalmente para que esses produtos possam ser incorporados no controle da doença em áreas já estabelecidas com populações resistentes de *M. fructicola* aos IQe's IDM's e MBC's.

No Brasil, o iprodiona é utilizado por mais de três décadas em diversos programas de pulverização pelo menos duas vezes a cada safra (MAY DE MIO; LUO; MICHAILIDES, 2011). O fungicida Rovral® e Rovral SC® (50% de ingrediente ativo, FMC Química do Brasil) são os únicos produtos químicos a base de iprodiona registrados para o controle da podridão-parda no Brasil (AGROFIT, 2018). Embora a resistência ao iprodiona já tenha sido relatada em outros países, não há informações presentes na literatura brasileira sobre a sensibilidade de *M. fructicola* a esse fungicida.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo investigar a sensibilidade em isolados de *M. fructicola* ao iprodiona oriundos das principais regiões produtoras do Brasil entre os anos de 2003 a 2017 e determinar em condições laboratoriais, a eficiência do produto no controle da doença em pêssegos *in natura*.

## 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.2.1 Obtenção dos isolados

Foram utilizados 175 isolados de *M. fructicola* oriundos da coleção pertencente ao Laboratório de Epidemiologia para Manejo Integrado de Doenças (LEMID) da Universidade Federal do Paraná. A coleção foi proveniente de flores e frutos (incluindo frutos mumificados) de pomares comerciais de pêssigo e nectarinas, coletados nos estados de São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul, entre os anos de 2003 à 2017 (TABELA 1). Os isolados até a safra de 2010 são monospóricos enquanto os isolados das safras posteriores (2015 e 2017) foram obtidos a partir de crescimento de ponta de hifa. Os isolados encontravam-se preservados em glicerol (isolados da safra 2003 a 2008), água destilada esterilizada (Castellani, 1973) (2009 e 2010), e papel filtro (2015 e 2017), e foram reativados em meio de batata-dextrose-ágar (BDA) (Hi Media Laboratories®, Mumbai) e mantidos em incubadoras de demanda bioquímica de oxigênio (BOD) durante dez dias a 23°C.

**TABELA 1** –INFORMAÇÕES DOS ISOLADOS DE *Monilinia fructicola* UTILIZADOS NESSE ESTUDO

Ano	Parte da planta	ESTADO <sup>1</sup>		
		PR	SP	RS
2002	Fruto	100	-	-
2003	Fruto	-	-	115, 119, 121
	Flor	132		
2004	Fruto	152	-	-
2005	Fruto	-	161, 162	-
	Múmia	-	-	400
2006	Fruto	-	200, 2004, 2005, 2013	-
2007	Fruto	-	316, 317, 321	-
	Flor	181	-	-
2008	Flor		340	-
	Múmia	-	341, 342, 343, 345, 346	
2009	Fruto	630, 638, 639, 642, 646	-	-
	Múmia	-	752, 753, 802, 807, 808, 826, 836, 862, 904, 929, 935, 945, 951, 952	-
2010	Fruto	-	-	960, 969, 977, 979, 988, 996, 1002, 1004, 1010, 1012, 1017, 1019, 1021
	Múmia	1023, 1043, 1050, 1054, 1057, 1069, 1071, 1086, 1087	1099	1020
2015	Múmia	A31, A58, A64, A72, CL5, CL15, CL26, CL27, CL43, CL45	C24, C25, C26, C3, C64, C66, S25, S28, S35, S37, S48	
2017	Múmia	PR17-07, 08, 09, 10, 11, 13, 14, 16, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 25, 30, 31, 32, 37, 81, 41, 42, 44, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 56, 57, 58, 59, 60, 63, 64, 66, 67, 69, 73, 76, 83, 84.	SP17-01, 02, 03, 10, 11, 13, 16, 17, 19, 21, 23, 24, 30, 32, 33, 34, 36, 37, 43, 44, 50, 51, 52, 54, 53, 55	-

<sup>1</sup> PR=Paraná, SC=Santa Catarina, RS= Rio Grande do Sul

### 3.2.2 Avaliação da sensibilidade de *Monilinia fructicola* ao iprodiona

#### I. Avaliação por meio de dose discriminatória:

Discos de micélio contendo cinco milímetros de diâmetro, de cada isolado, foram retirados da borda de colônias com sete dias de idade e transferidos para placas de contendo meio BDA sem fungicida (controle) e meio BDA acrescido com 5 µg/mL de iprodiona (Rovral SC®; BASF Agri Production S.A). Em cada placa, foram transferidos quatro discos de micélio pertencentes de diferentes isolados, considerando-se três repetições (placas) por isolado (APÊNDICE B). As placas foram incubadas em BOD a 23°C por sete dias. O diâmetro médio da colônia (Dc) para cada isolado foi obtido a partir de duas medições perpendiculares do diâmetro da colônia, com auxílio de um paquímetro. A percentagem de inibição do crescimento micelial foi obtida usando a relação  $\% \text{ ICM} = [(C - T) / C] \times 100$ , em que C refere-se ao diâmetro da colônia sem a adição de fungicida (controle) e T o diâmetro da colônia tratada com o fungicida.

Os isolados foram classificados quanto ao fenótipo em: extremamente sensíveis (SS) quando o crescimento micelial foi 100% inibido; moderadamente sensíveis (S) quando a percentagem de inibição do crescimento micelial foi menor que 99% e maior que 70%; e resistentes (R) quando a percentagem de inibição do crescimento micelial foi menor que 70% em 5 µg/mL de iprodione. Essa classificação foi baseada em estudos realizados por Webber e Hahn (2011) para germinação de esporos de *Botrytis spp.* e adaptada nesse estudo, para crescimento micelial.

#### I. Determinação da EC<sub>50</sub>:

Para esse experimento, foram selecionados 18 isolados (9 isolados de cada fenótipo obtido pela dose discriminatória) que contemplassem todas as safras e estados. Uma solução estoque de 1000 µg/mL de iprodiona foi preparada a partir do produto comercial (Rovral SC®; BASF Agri Production), adicionando-se apropriadas concentrações do ingrediente ativo em água destilada esterilizada. Em primeiro experimento, discos de micélio contendo cinco milímetros de diâmetro, de cada isolados foram transferidos para o meio BDA contendo iprodiona nas concentrações

de 0; 0,75; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3 e 4 µg/mL. Nessas concentrações, os dados observados não se ajustaram ao modelo de regressão linear simples e portanto não foi possível estimar a concentração que inibe 50% o crescimento micelial. Com isso, foi necessária a realização de um segundo experimento utilizando-se concentrações com intervalos menores (0, 0,16; 0,31; 0,63; 1,25; 2,5; e 5 µg/mL de iprodiona). Após sete dias, foi avaliado o crescimento micelial por duas medições perpendiculares do diâmetro da colônia com auxílio de um paquímetro, obtendo-se assim, o diâmetro médio para cada colônia. A percentagem de inibição do crescimento micelial (%ICM) foi calculada como descrito anteriormente. As concentrações do fungicida que inibem o crescimento micelial em 50% (valores EC<sub>50</sub>) foram estimados para cada isolado a partir de regressões lineares simples entre os valores de %ICM e das concentrações de fungicida transformada em log<sub>10</sub>, onde o coeficiente de regressão foi significativo em  $P < 0,05$ . Os experimentos mencionados anteriormente foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado com três repetições por concentração de fungicida.

### 3.2.3 Eficiência de controle e incidência de *M. fructicola* em frutos tratados com iprodiona

Para condução desse ensaio foram utilizados três isolados: um com alta (>0,70 µg/mL), intermediária (0,40-0,69 µg/mL) e baixa (0,1-0,39 µg/mL) sensibilidade, respectivamente. Esses isolados foram selecionados a partir dos resultados dos experimentos para determinação da EC<sub>50</sub>.

Pêssegos em ponto de maturação da variedade Eldorado, com diâmetro entre 45 à 53 milímetros, foram desinfestados por imersão em 70% etanol por um minuto, seguido por solução de 0,5% hipoclorito de sódio por mais um minuto e enxaguados por três vezes em água destilada esterilizada. Os frutos foram inoculados com e sem ferimento. No primeiro caso, um ferimento de três milímetros de profundidade foi realizado em cada fruto com auxílio de uma agulha histológica antes do tratamento com fungicida. Posteriormente, os frutos com e sem ferimento foram previamente imersos na calda ajustada de Rovral SC® na concentração de 150mL / 100L de água. Os frutos não tratados foram utilizados como controle dos ensaios. Após completa secagem dos frutos, estes foram individualizados em recipientes plásticos

transparentes. A umidade relativa foi mantida em torno de 90% dentro de cada recipiente.

Após 24 horas do tratamento com o fungicidas, os frutos foram inoculados com 40 µL de suspensão contendo  $2 \times 10^5$  esporos/mL e mantidos a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  durante cinco dias. Posteriormente, a incidência de cada isolado foi determinada e o diâmetro da lesão dos frutos foi mensurado com auxílio de um paquímetro digital. A eficiência do controle da doença (CD) foi estimada utilizando a seguinte fórmula:  $CD = ((DL_C - DL_T) / DL_C) * 100$ , onde  $DL_C$  é a média do diâmetro da lesão (mm) dos frutos controles não tratados com os fungicidas e  $DL_T$  é a média do diâmetro da lesão (mm) dos frutos tratados com os fungicidas. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, utilizando dez e três repetições por isolado nos frutos com ferimentos e sem ferimento, respectivamente. Pela disponibilidade de frutos, optou-se por fazer mais repetições nos experimentos com ferimento pois este simula condições que podem ser encontradas a campo para infecção do patógeno nos frutos. Os ensaios foram conduzidos duas vezes e a média da CD e incidência dos dois experimentos foram utilizados na análise dos dados.

Concomitantemente com os experimentos em frutos, foi aferida a viabilidade dos conídios utilizados na inoculação dos frutos em meio ágar- água (AA). Uma alíquota de 100 µL da suspensão de conídios foi depositada na superfície do meio AA nas placas e espalhada com auxílio de uma alça de Drigalski. As placas foram incubadas em BOD a  $25^\circ\text{C}$  no escuro, e após 16 horas, a germinação foi paralisada espalhando-se uma gota 100 µL de lactoglicerol no meio AA. Avaliou-se a percentagem de germinação de conídios em microscópio de luz, contando-se 100 conídios por placa. Foram considerados germinados os conídios que apresentavam tubo germinativo com comprimento de pelo menos 1,5 vezes maior que o comprimento do conídio. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com três repetições por isolado.

### 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os isolados da população brasileira foram fenotipicamente sensíveis ao iprodiona. A frequência de isolados extremamente sensíveis (SS) e moderadamente sensíveis (S) foi de 73,7% e 26,3%, respectivamente.

Os isolados SS apresentaram 100% de inibição em meio BDA com 5 µg/mL de iprodione e a média do diâmetro da colônia desses isolados na ausência do fungicida foi 20,90 mm ( $\pm 7,33$ ) (APÊNDICE A). Em contraste, os isolados S apresentaram colônias com medidas entre 0,1 a 6 mm no meio BDA acrescido com fungicida e a média do diâmetro da colônia sem o fungicida foi de 21,22 mm ( $\pm 5,42$ ) (TABELA 2).

Não foram encontrados fenótipos resistentes no presente estudo a partir das doses discriminatórias. Nos EUA, o iprodiona tem sido usado por vários anos, e desde a década de 1980, não há relatos de isolados de *M. fructicola* resistentes a esse produto (MA; LUO; MICHAILIDES, 2006; YOSHIMURA et al., 2004). Entretanto, isolados resistentes já foram facilmente obtidos e caracterizados em laboratório (RICHIE, 1982; MA; MICHAILIDES, 2006). Elmer e Gaunt (1993) na Nova Zelândia encontraram populações resistentes de *M. fructicola* às DC's na dose discriminatória de 5µg/mL em meio ágar-água (AA). Utilizando intervalos de EC<sub>50</sub>, esses mesmos autores encontraram isolados de *M. fructicola* com baixa (LR) e alta resistência (HR) às DC's (ELMER; GAUNT 1994). Em contraste, isolados de *Botrytis cinerea* considerados HR, raramente são encontrados no campo e a ocorrência de isolados LR são mais facilmente observadas nessas condições (POMMER; LORENZ, 1987; BEEVER et al., 1989).

Várias formas de classificação e avaliação do nível de resistência ao iprodiona podem ser encontrados na literatura. Por exemplo, alguns autores utilizam doses discriminatórias (ELMER; GAUNT, 1994; MA et al., 2005; EGÜEN et al., 2015), outros consideram intervalos de EC<sub>50</sub> (FARETRA; POLLASTRO, 1991; YOSHIMURA et al., 2004), e outros ainda adotam o fator de resistência (HRUSTIĆ et al., 2017). As doses discriminatórias têm sido úteis para triagem inicial de isolados resistentes pois exigem menos tempo e material quando comparadas com ensaios para avaliação de EC<sub>50</sub> (LICHTENBERG et al, 2016).

**TABELA 2 – PERCENTAGEM DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL (%ICM) E FENÓTIPOS OBTIDOS A PARTIR DA DOSE DISCRIMINATÓRIA DE 5 µg/ml DE IPRODIONA.**

Isolado	0 µg/mL	5 µg/mL	ICM	Fenótipo <sup>2</sup>
	D <sub>c</sub> (mm) <sup>1</sup>		%	
119	25,75	0,58	97,73	S
121	31,97	0,44	98,62	S
185	22,05	0,5	97,73	S
204	23,3	2,07	91,12	S
205	22,06	0,37	98,34	S
316	23,57	0,83	96,46	S
752	12,58	1,67	86,75	S
802	15	0,17	98,89	S
807	15,83	1,67	89,47	S
836	31,17	0,83	97,33	S
862	19,65	2,22	88,72	S
945	17,47	3,17	81,87	S
951	17,17	0,67	96,12	S
979	16,47	0,28	98,28	S
1017	29,13	1,22	95,82	S
1019	26,4	0,69	97,37	S
1057	21,75	1,57	92,77	S
1087	29,92	0,4	99	S
A31	19,12	4,13	78,39	S
CL45	23,25	0,9	96,14	S
C3	25,86	6,09	76,47	S
C24	23,17	0,31	98,65	S
C26	21,36	0,57	97,33	S
C66	35,8	1,36	96,2	S
S28	20,82	1,16	94,43	S
S37	19,37	5,02	74,06	S
S48	20,59	1,3	93,69	S
PR17-14	15,63	0,87	94,4	S
PR17-20	12,94	1,28	90,08	S
PR17-21	13,85	0,7	94,97	S
SP17-52	16,43	3,18	80,65	S
SP17-43	15,83	3,35	78,8	S
SP17-44	16,78	1,87	88,84	S
SP17-02	14,44	1,13	92,18	S
SP17-16	23,41	0,47	98,01	S
SP17-33	24,29	4,73	80,52	S
SP17-54	20,2	3,38	83,3	S
SP17-50	21,85	1,69	92,28	S
SP17-37	22,95	2	91,3	S
SP17-10	23,25	5,96	74,35	S
SP17-51	20,49	2,46	87,98	S
PR17-67	9,95	1,61	83,78	S [...]



Isolado	0 µg/mL	5 µg/mL	ICM <sup>3</sup>	Fenótipo <sup>2</sup>
	D <sub>c</sub> (mm) <sup>1</sup>		%	
PR17-84	26,47	0,73	97,24	S
PR17-56	24,54	2,67	89,12	S
PR17-76	21,53	2,53	88,2	S
PR17-60	21,1	0,83	96,08	S

<sup>1</sup> D<sub>c</sub>=Diâmetro da colônia (mm); ICM=percentagem de inibição do crescimento micelial

<sup>2</sup> S= moderadamente sensível

<sup>3</sup> ICM= percentagem de inibição do crescimento micelial.

A EC<sub>50</sub> dos isolados utilizados nesse trabalho variou de 0,11 à 1,05 µg/mL sendo a média estimada em 0,48 µg/mL (TABELA 3). A EC<sub>50</sub> média para SS e S foi 0,32 a 0,64 µg/mL, respectivamente.

**TABELA 3 - CONCENTRAÇÃO EFETIVA PARA INIBIÇÃO DE 50% DO CRESCIMENTO MICIAL DE UMA POPULAÇÃO DE ISOLADOS DE *Monilinia fructicola* PARA O FUNGICIDA IPRODIONA**

<sup>1</sup> Isolado	<sup>2</sup> Fenótipo	Ano	<sup>3</sup> Estado	EC <sub>50</sub> iprodiona (µg/mL)
<b>115</b>	<b>SS</b>	<b>2003</b>	<b>RS</b>	<b>0,11</b>
400	SS	2005	RS	0,44
205	S	2006	SP	0,36
181	SS	2007	PR	0,53
321	SS	2007	SP	0,48
187	SS	2008	PR	0,10
638	SS	2009	PR	0,28
929	SS	2009	SP	0,14
996	SS	2010	RS	0,32
1099	SS	2010	SP	0,46
<b>1017</b>	<b>S</b>	<b>2010</b>	<b>RS</b>	<b>0,83</b>
1057	S	2010	PR	0,81
<b>A31</b>	<b>S</b>	<b>2015</b>	<b>PR</b>	<b>0,54</b>
C66	S	2015	SP	0,59
S37	S	2017	SP	0,71
SP17-43	S	2017	SP	1,05
SP17-33	S	2017	SP	0,39
SP17-10	S	2017	SP	0,52

<sup>1</sup> Isolados em negrito correspondem aos isolados utilizados para inoculação dos frutos tratados com iprodione. <sup>2</sup> SS= Extremamente sensível (SS); S= moderadamente sensível. <sup>3</sup> PR=Paraná; SP=São Paulo; RS=Rio Grande do Sul.

Os valores da EC<sub>50</sub> encontrados nesse estudo correspondem aos valores de EC<sub>50</sub> para isolados sensíveis observados na literatura (EGUEN; MELGAREJO; DE CAL, 2015; ELMER; GAUNT, 1994). Na Espanha, valores de EC<sub>50</sub> de isolados resistentes de *M. fructicola* variaram entre 2,1 e 3,5 µg/mL, enquanto as EC<sub>50</sub> dos

isolados sensíveis estavam entre 1,2 e 1,6 µg/mL (EGUEN; MELGAREJO; DE CAL, 2015). Em comparação, na Nova Zelândia valores de EC<sub>50</sub> entre 3 e 217 µg.mL<sup>-1</sup> foram encontrados para isolados de *M. fructicola* com baixa resistência (LR) e alta resistência (HR) (ELMER; GAUNT, 1994).

A incidência da podridão-parda e a CD em pêssegos com ferimentos tratados com iprodiona variou conforme o grau de sensibilidade dos isolados. Por exemplo, a menor incidência e maior CD foi observada no isolado 115, que possui menor EC<sub>50</sub>. Os conídios dos isolados utilizados nos ensaios apresentaram viabilidade acima de 90%, demonstrando a validade destes resultados (TABELA 4).

**TABELA 4** - VIABILIDADE DE CONÍDIOS DE *M. fructicola*, INCIDÊNCIA E EFICIÊNCIA DO CONTROLE DA PODRIDÃO-PARDA EM PÊSSEGOS TRATADOS COM IPRODIONA

Isolado	<sup>1</sup> Fenótipo	EC <sub>50</sub> µg/mL	Viabilidade de conídios (%)	COM FERIMENTO		SEM FERIMENTO	
				Incidência (%)	<sup>2</sup> CD (%)	Incidência (%)	CD (%)
115	SS	0,11	98	15	93,19	0	100
1017	S	0,83	100	20	87,05	0	100
A31	S	0,54	99,5	30	87,08	0	100

<sup>1</sup> SS= extremamente sensível; S=moderadamente sensível

<sup>2</sup> A eficiência de controle da doença (CD) foi determinada após cinco dias de inoculação de *M. fructicola* utilizando-se a relação  $CD = (DLC-DLT) / DLC \times 100$ , em que DC e DT é a média do diâmetro da lesão (mm) dos frutos controles e tratados com iprodiona na dose 1,5 mL /L, respectivamente.

Todos os frutos sem ferimento não apresentaram sintomas demonstrando a sensibilidade desses isolados ao fungicida. Entretanto, a condição de ferimento nos frutos facilitou a infecção por *M. fructicola*, e portanto, foi possível observar a incidência da doença mesmo com o tratamento de iprodiona. Ferimentos causados por insetos, por granizo ou pela manipulação do fruto na colheita e pós-colheita facilitam a penetração e infecção do patógeno (OGAWA et al., 1995). Contudo, a CD foi sempre maior que 85%. Este nível de controle está acima do nível estabelecido na portaria nº 91 de 2015 (ADAPAR, 2017) que prevê a eficiência mínima de 80% para regulamentação no cadastro de agrotóxicos no Paraná. No campo, as condições normalmente são subótimas, o que dificulta a infecção. Nesse caso, raramente a incidência da doença chegaria a ser alta caso os frutos recebam o tratamento com iprodiona de forma homogênea. No Paraná e no Rio Grande do Sul o uso das DC's como iprodiona e procimidona já se mostrou satisfatório em condições de campo. O tratamento em pré-colheita com esses fungicidas promoveu maior sanidade dos frutos

devido à redução na incidência da podridão-parda na pós-colheita (MOREIRA; MAY DE MIO, 2009; PAVANELLO et al., 2015).

O iprodiona é utilizado no Brasil em diversos programas de pulverização pelo menos uma vez a cada safra, e até o presente momento não foram relatados estudos sobre resistência de *M. fructicola* a esse produto. A alta sensibilidade ao iprodiona encontrada nos isolados brasileiros podem ser explicadas, principalmente pela baixa pressão de seleção exercida por esse fungicida devido ao manejo correto adotado pelos produtores, respeitando as recomendações de não exceder mais de três aplicações por safra (comunicação pessoal).

A detecção dos isolados resistentes pode ser difícil devido à baixa adaptabilidade dos isolados. Katan e Shabi (1982) encontraram que a frequência (taxa de mutação) da resistência às DC's em *Monilinia laxa* foi pelo menos 100 vezes maior que a taxa de mutação aos MBC's. No entanto, parece que a baixa taxa de detecção de isolados resistentes às DC's em comparação com isolados resistentes aos MBC's foi associada à redução da adaptabilidade dos isolados no campo (DELP, 1988). Entretanto, esse não foi o caso, pois neste trabalho foi observado que a sensibilidade de *M. fructicola* ao iprodiona foi constante entre as safras de 2002 e 2017.

Há poucos estudos recentes envolvendo resistência de *M. fructicola* às DC's (EGUEN; MELGAREJO; DE CAL, 2015; HRUSTIĆ et al., 2017), sendo a maioria das pesquisas com esses fungicidas realizadas entre as décadas de 80 e 90. Nesse trabalho foi possível gerar informações de como se encontram a sensibilidade dos isolados de *M. fructicola* oriundos das principais regiões produtoras no Brasil. Acredita-se que, caso seja feito o uso criterioso do iprodiona, é pouco provável a ocorrência da seleção de isolados de *M. fructicola* resistentes a esse produto dentro dos próximos anos. A possibilidade de problemas com o aumento da população do patógeno resistente ao fungicida pode ser maior onde as DC's são usadas intensivamente e exclusivamente, como ocorre em alguns casos no controle do mofo cinzento em morango. Por exemplo, na Alemanha o iprodiona foi bastante utilizado até 2009, onde teve seu registro expirado para o controle de *Botrytis cinerea* devido aos casos de resistência. Altas frequências de isolados resistentes foram encontradas em diversas regiões da Alemanha, inclusive na região central do país, onde foram relatadas frequências superiores à 70% (LEROCH et al., 2013).

A resistência ao iprodiona, provavelmente, poderá ser adiada ainda mais se fungicidas com diferentes modos de ação forem integrados em programas de

pulverização da podridão-parda. Além disso, todas as estratégias anti-resistência sugerida pelo Comitê de Ação de Resistência a Fungicidas (FRAC, 2017) devem ser aplicadas, em particular a redução da pressão de seleção, minimizando o número de aplicações (não mais de duas ou três por safra) e a manutenção regular de tempos prolongados sem exposição às dicarboximidas.

### 3.4 CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

Os isolados de *M. fructicola* oriundos das principais regiões brasileiras produtoras de pêssego, apresentaram alta sensibilidade ao iprodiona. O produto à base de iprodiona aplicado em frutos pós colheita proporcionou controle eficiente da podridão-parda. Portanto, este fungicida deve ser mantido no manejo da doença, especialmente em áreas com relato de resistência a outros grupos químicos.

Frente às poucas opções de produtos registrados para o controle preventivo da podridão-parda, estudos futuros devem ser conduzidos em condições de campo para monitorar a eficiência de controle não só desse fungicida, mas também de outros produtos registrados para a cultura.

## REFERÊNCIAS

- ADAPAR – **Agência de Defesa Agropecuária do Paraná**. Disponível em: <<http://www.adapar.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=246>>. Acesso em: 05/01/2018.
- AGROFIT- **Sistema de agrotóxicos fitossanitários**. Disponível em: <[http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em 12/1/2018.
- AMIRI, A.; BRANNEN, P. M.; SCHNABEL, G. Reduced sensitivity in *Monilinia fructicola* field isolates from South Carolina and Georgia to respiration inhibitor fungicides. **Plant disease**, v. 94, n. 6, p. 737-743, 2010.
- BEEVER, R. E.; BRIEN, H. M. R. A survey of resistance to the dicarboximide fungicides in *Botrytis cinerea*. **New Zealand journal of agricultural research**, v. 26, n. 3, p. 391-400, 1983.
- BEEVER, R. E.; LARACY, E. P.; PAK, H. A. Strains of *Botrytis cinerea* resistant to dicarboximide and benzimidazole fungicides in New Zealand vineyards. **Plant pathology**, v. 38, n. 3, p. 427-437, 1989.
- BRENT, K J., D W. HOLLOMON. Fungicide Resistance in Crop Pathogens, How Can it be Managed? FRAC Monograph No. 1 (second, revised edition), **Croplife international**. Brussels, 2007.
- CASTELLANI, Aldo. The "water cultivation" of pathogenic fungi. **J Trop Med Hyg**, v. 66, p. 283-284, 1963.
- CHEN, F.; LIU, X.; SCHNABEL, G. Field strains of *Monilinia fructicola* resistant to both MBC and DMI fungicides isolated from stone fruit orchards in the eastern United States. **Plant disease**, v. 97, n. 8, p. 1063-1068, 2013.
- CUI, W.; BEEVER, R. E.; PARKES, S. L.; TEMPLETON, M. D. Evolution of an osmosensing histidine kinase in field strains of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) in response to dicarboximide fungicide usage. **Phytopathology**, v. 94, n. 10, p. 1129-1135, 2004.
- DELP, C. J. Fungicide Resistance in North America. **The American Phytopathological Society**, St. Paul, MN. 133 p, 1988.
- EGÜEN, B.; MELGAREJO, P.; DE CAL, A. Sensitivity of *Monilinia fructicola* from Spanish peach orchards to thiophanate-methyl, iprodiona, and cyproconazole: fitness analysis and competitiveness. **European Journal of Plant Pathology**, v. 141, n. 4, p. 789-801, 2015.
- ELMER, P. A. G.; GAUNT, R. E. survey of fungicide insensitivity in *Monilinia fructicola*. In: Proceedings of the thirty ninth New Zealand weed and pest control conference. **New Zealand Weed and Pest Control Society**, p. 166-169. 1986.

ELMER, P. A. G.; GAUNT, R. E. Effect of frequency of dicarboximide applications on resistant populations of *Monilinia fructicola* and brown rot in New Zealand orchards. **Crop Protection**, v. 12, n. 2, p. 83-88, 1993.

FARETRA, F.; POLLASTRO, S. Genetic basis of resistance to benzimidazole and dicarboximide fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). **Mycological Research**, v. 95, n. 8, p. 943-951, 1991.

FRAC- **Fungicide Resistance Action Committee**. Disponível em: <<http://www.frac.info/>>. Acesso em: 02/01/2018

HAMADA, M. SOBHY; Y., YANNI; MA, Z. Sensitivity to iprodiona, difenoconazol and fludioxonil of *Rhizoctonia cerealis* isolates collected from wheat in China. **Crop Protection**, v. 30, n. 8, p. 1028-1033, 2011.

HEON, L. T. Incidence of benzimidazole and dicarboximide resistant isolates of *Monilinia fructicola* from overwintering mummies and peduncles on peach trees. **Korean J. Plant Pathol.**, 1998.

HOLB, I. J. The brown rot fungi of fruit crops (*Monilinia* spp.): II. Important features of their epidemiology. **International Journal of Horticultural Science** Hungary, 2004.

HOLZ, B. Über eine Resistenzerscheinung von *Botrytis cinerea* an Reben gegen die neuen Kontaktbotrytizide im Gebiet der Mittelmose. **Weinberg und Keller**, 1979.

HRUSTIĆ, J., MIHAJLOVIĆ, M., GRAHOVAC, M., DELIBAŠIĆ, G., TANOVIĆ, B. Fungicide sensitivity, growth rate, aggressiveness and frost hardiness of *Monilinia fructicola* and *Monilinia laxa* isolates. **European Journal of Plant Pathology**, p. 1-12, 2017.

KATAN, T.; SHABI, E. Characterization of a dicarboximide-fungicide-resistant laboratory isolate of *Monilinia laxa*. **Phytoparasitica**, v. 10, n. 4, p. 241-245, 1982.

LEROCH, M., PLESKEN, C., WEBER, R. W., KAUFF, F., SCALLIET, G., & HAHN, M. Gray mold populations in German strawberry fields are resistant to multiple fungicides and dominated by a novel clade closely related to *Botrytis cinerea*. **Applied and environmental microbiology**, v. 79, n. 1, p. 159-167, 2013.

LICHTENBERG, P. S. F., ZEVIANI, W. M., MORALES, R. G. F., MICHAILIDES, T. J., MAY-DE-MIO, L. L. Shift in *Monilinia fructicola* sensitivity to tebuconazol fungicide, and resistance survey in Southern Brazil. In: Modern fungicides and antifungal compounds VII. Proceedings of the 17th International Reinhardtsbrunn Symposium, April 21-25 2013, Friedrichroda, Germany. Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft eV Verlag, p. 173-178, 2014.

LICHTENBERG, P. S. F.; PRIMIANO, I. V.; FISCHER, J. M.; GLIENKE, C.; AMORIM, L.; MAY DE MIO, L. L. Resistência de *Monilinia* spp. aos fungicidas do grupo Inibidores da Desmetilação (IDM), Inibidores da Quinona Externa (IQe) e dos Metilo Benzimidazol Carbamatos (MBC). **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 24, p. 145-173, 2016.



LICHTENBERG, P. S., LUO, Y., MORALES, R. G., MUEHLMANN-FISCHER, J. M., MICHAILIDES, T. J., MAY DE MIO, L. L. The Point Mutation G461S in the MfCYP51 Gene is Associated with Tebuconazol Resistance in *Monilinia fructicola* Populations in Brazil. **Phytopathology**, p. PHYTO-02-17-0050-R, 2017.

MA, Z.; MICHAILIDES, T. J.; Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. **Crop Protection**, v. 24, n. 10, p. 853-863, 2005.

MA, Z.; LUO, Y.; MICHAILIDES, T.J. Molecular characterization of the two-component histidine kinase gene from *Monilinia fructicola*. **Pest management science**, v. 62, n. 10, p. 991-998, 2006.

MA, Z.; YAN, L.; LUO, Y.; Michailides, T. Sequence variation in the two component histidine kinase gene of *Botrytis cinerea* associated with resistance to dicarboximide fungicides. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 2007, Vol. 88. N°3, 2007.

MAY-DE MIO, L. L.; MONTEIRO, L. B.; DE NAZARENO, N. R. X.; HICKEL, E. Classificação e manejo dos agroquímicos em fruteiras de caroço. In: MONTEIRO, L. B.; MAY-DE MIO, L. L.; SERRAT, B. M.; MOTTA, A. C.; CUQUEL, F. L. **Fruteiras de caroço: uma visão ecológica**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2004. p. 263-297.

MAY-DE MIO, L. L.; LUO, Y.; MICHAILIDES, T. J. Sensitivity of *Monilinia fructicola* from Brazil to tebuconazol, azoxystrobin, and thiophanate-methyl and implications for disease management. **Plant Disease**, v. 95, n. 7, p. 821-827, 2011.

MAY DE MIO, L.L.; GARRIDO, L.R.; UENO, B.; FARJADO, T.V.M. Doenças da cultura do pessegueiro e métodos de controle. p.355-366. In: RASEIRA, M. C.B.; PEREIRA, J. F. M.; CARVALHO, F. L. C. **Pessegueiro**, 1º Edição. Embrapa, Brasília, DF, 2014. 780p.

MOREIRA, L. M.; MAY DE MIO, L.L.; SANHUEZA, R.M.V.; LIMA, M.L.R.C.; POSSAMAI, J.C. Controle em pós-colheita de *Monilinia fructicola* em pêssegos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, n. 4, p. 395-398, 2002.

MOREIRA, L. M.; MAY-DE MIO, L. L. Control of peach tree brown rot by fungicides and phosphites evaluated during preharvest and postharvest. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, n. 2, p. 405-411, 2009.

NORTHOVER, J.; MATTEONI, J.A. Resistance of *Botrytis cinerea* to benomil and iprodiona in vineyards and greenhouse after exposure to the fungicides alone or mixed with captan. **Plant Disease**, St. Paul, v.70, p.398- 402, Apr. 1986.

OGAWA, J. M.; ZEHR. E. I.; BIRD, G. W.; RITCHIE, D. F.; URIU, K; UYEMOTO, J. K. ed. Compendium of stone fruit diseases, St. Paul: APS Press, 1995. 98p.

PAVANELLO, E.P.; BRACKMANN, A; THEWES, F.R.; BOTH, V.; DOS SANTOS, J. R. A.; SCHORR, M. R. W. Eficiência de fungicidas no controle da podridão-parda do pessegueiro e sua relação com parâmetros fisiológicos dos frutos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, n. 1, p. 67-76, 2015.



PENROSE, L. J.; KOFFMANN, W.; NICHOLLS, M. R. Field occurrence of vinclozolin resistance in *Monilinia fructicola*. **Plant pathology**, v. 34, n. 2, p. 228-234, 1985.

PEREIRA, W. V., PRIMIANO, I. V., MORALES, R. G., PERES, N. A., AMORIM, L., & MAY DE MIO, L. L. Reduced Sensitivity to Azoxystrobin of *Monilinia fructicola* Isolates From Brazilian Stone Fruits is Not Associated With Previously Described Mutations in the Cytochrome b Gene. **Plant Disease**, v. 101, n. 5, p. 766-773, 2017.

POMMER, E. H.; LORENZ, G. Resistance of *Botrytis cinerea* Pers. to dicarboximide fungicides- a literature review. **Crop protection**, v. 1, n. 2, p. 221-230, 1982.

PORTER, D. M.; PHIPPS, P. M. Tolerance of *Sclerotinia minor* to procymidone and cross tolerance to other dicarboximide fungicides and dicloran. **Peanut Science**, v. 12, n. 1, p. 41-45, 1985.

RITCHIE, D. F. Mycelial growth, peach fruit-rotting capability, and sporulation of strains of *Monilinia fructicola* resistant to dichloran, iprodiona, procymidone, and vinclozolin. **Phytopathology**, v. 73, p. 44-47, 1983.

SANOAMUANG, N.; GAUNT, R. E. Persistence and fitness of carbendazim-and dicarboximide-resistant isolates of *Monilinia fructicola* (Wint.) Honey in flowers, shoots and fruit of stone fruit. **Plant pathology**, v. 44, n. 3, p. 448-457, 1995.

SZTEJNBERG, A.; JONES, A. L. Tolerance of the brown rot fungus *Monilinia fructicola* to iprodione, vinclozolin and procymidone fungicides. **Phytopathology News**, v. 12, p. 187-188, 1978

VIAUD, M., FILLINGER, S., LIU, W., POLEPALLI, J. S., LE PÊCHEUR, P., KUNDURU, A. R., ... & LEGENDRE, L. A class III histidine kinase acts as a novel virulence factor in *Botrytis cinerea*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 19, n. 9, p. 1042-1050, 2006.

VILLANI, S. M.; COX, K. D. Characterizing fenbuconazole and propiconazole sensitivity and prevalence of 'Mona' in isolates of *Monilinia fructicola* from New York. **Plant disease**, v. 95, n. 7, p. 828-834, 2011

WEBER, R. W. S; HAHN, M. A rapid and simple method for determining fungicide resistance in *Botrytis*. **Journal of Plant Diseases and Protection**, p. 17-25, 2011.

YOSHIMURA, M. A.; LUO, Y.; MA, Z.; MICHAILIDES, T. J. Sensitivity of *Monilinia fructicola* from stone fruit to thiophanate-methyl, iprodiona, and tebuconazol. **Plant disease**, v. 88, n. 4, p. 373-378, 2004.

YOUNG, D.H. Mechanisms of Resistance: Anti-tubulin agents IN: ISHII, Hideo; HOLLOMAN, D. W. **Fungicide Resistance in Plant Pathogens**. Tokyo: Springer, doi, v. 10, p. 978-4, 2015.

## Capítulo II

### **RESISTÊNCIA MÚLTIPLA DE *Monilinia fructicola* AOS IDM, IQe, E MBC E COMPARAÇÃO DOS FENÓTIPOS QUANTO AOS COMPONENTES DE ADAPTABILIDADE**

#### 4 CAPÍTULO II - RESISTÊNCIA MÚLTIPLA DE *Monilinia fructicola* AOS IDM, IQE, E MBC E COMPARAÇÃO DOS FENÓTIPOS QUANTO AOS COMPONENTES DE ADAPTABILIDADE

##### RESUMO

O controle de *Monilinia fructicola*, agente causal da podridão-parda do pessegueiro, é principalmente realizado com aplicação de fungicidas dos grupos Metil Benzimidazóis Carbamatos (MBC), Inibidores da Quinona Externa (IQE) e Inibidores da Desmetilação C14 (IDM). No Brasil, trabalhos sobre isolados de *M. fructicola* com sensibilidade reduzida a um ou mais produtos são escassos, atestando a necessidade da avaliação de resistência múltipla entre grupos, além de estudos sobre a adaptabilidade dos isolados múltiplo resistentes. Os objetivos desse trabalho foram: (a) verificar a sensibilidade de *M. fructicola* aos IDM's (tebuconazol, difenoconazol, propiconazol e protioconazol), MBC's (tiofanato-metílico e carbendazim) e IQE's (azoxistrobina, piraclostrobina, picoxistrobina); (b) verificar a ocorrência da resistência múltipla de *M. fructicola* ao tiofanato-metílico (TM), tebuconazol (TEB) e azoxistrobina (AZO), avaliando os fenótipos encontrados quanto aos componentes de adaptabilidade e (d) verificar a ocorrência da resistência prática em frutos tratados com os fungicidas. A sensibilidade aos fungicidas foi determinada a partir de testes *in vitro* (doses discriminatórias e EC<sub>50</sub>) avaliando-se isolados de *M. fructicola* coletados no estados de São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul, entre os anos de 2003 a 2017. Os componentes de adaptabilidade *in vitro* (crescimento micelial, sensibilidade osmótica, germinação de conídios e esporulação) e adaptabilidade *ex vivo* (agressividade em pétalas e frutos) foram determinados e comparados entre os fenótipos encontrados. Os resultados obtidos mostraram uma frequência de isolados resistentes ao TM, TEB e AZO de 41%, 33% e 26%, respectivamente. As frequências de isolados LR e HR aos MBC's foram de 26% e 7% com EC<sub>50</sub> média de 1,863 µg/mL e >1000 µg/mL, respectivamente. Isolados resistentes ao IDM's propiconazol e protioconazol apresentaram frequência de ocorrência menores que 8%. A média de EC<sub>50</sub> para difenoconazol, propiconazol e protioconazol foi de 0,07; 0,05 e 0,03 µg.mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Já os isolados TEBs apresentaram EC<sub>50</sub> média de 0,059 µg/mL enquanto os TEB<sub>R</sub> exibiram valores médios de 0,90 µg/mL. Nenhum dos isolados foram considerados resistentes a IQE piraclostrobina. A EC<sub>50</sub> dos isolados AZOs foram <0,2 µg/mL enquanto isolados AZO<sub>R</sub> apresentaram EC<sub>50</sub> entre 0,47 a 1,280 µg/mL. Foram identificados oito diferentes fenótipos, sendo os mais recorrentes TF<sub>S</sub>TEB<sub>S</sub>AZO<sub>S</sub> (33,3%), TF<sub>S</sub>TEB<sub>R</sub>AZO<sub>R</sub> (21,6%) e TF<sub>R</sub>TEB<sub>S</sub>AZO<sub>S</sub> (19,61%). Além disso, a maioria dos fenótipos resistentes exibiram crescimento micelial, produção de conídios, germinação *in vitro* e agressividade *ex vivo* superiores ou iguais ao fenótipo sensível (TF<sub>S</sub>TEB<sub>S</sub>AZO<sub>S</sub>). Ensaio em frutos inoculados e tratados com fungicidas confirmaram a maioria dos fenótipos classificados previamente *in vitro*.

**Palavras-chave:** Pessegueiro; Podridão-parda; Sensibilidade a fungicidas; Controle Químico; Agressividade.

## CHAPTER II - MULTIPLE AND CROSS RESISTANCE OF *Monilinia fructicola* TO DMI's, Qol's AND MBC's AND COMPARISON FITNESS COMPONENTS OF PHENOTYPES

### ABSTRACT

The control of *Monilinia fructicola*, the causal agent of brown rot of peaches, is mainly performed with the application of fungicides from the group of Methyl Benzimidazole Carbamates (MBC), Quinone Outside Inhibitors (Qol) and Demethylation C14Inhibitors (DMIs). In Brazil, there isn't much knowledge about phenotypes with reduced sensitivity to one or more products, requiring multiple evaluation between groups, in addition to studies to determinate fitness of these phenotypes. The objectives of the study are: (a) verify the sensitivity of *M. fructicola* to DMI's (tebuconazole, difenoconazole, propiconazole and prothioconazole), MBC's (thiophanate-methyl and carbendazim) and Qol's (azoxystrobin, pyraclostrobin, picoxystrobin); (b) investigate the occurrence of multiple resistance of *M. fructicola* to thiophanate-methyl (TM), tebuconazole (TEB) and azoxystrobin (AZO), evaluating fitness components of phenotypes and (d) confirm the occurrence of practical resistance in fruits treated with fungicides. The sensitivity to fungicides was studied from *in vitro* essays (discriminatory doses and EC<sub>50</sub>) evaluating isolates of *M. fructicola* collected in the states of São Paulo, Paraná and Rio Grande do Sul, from 2003 to 2017. The *in vitro* fitness components (mycelial growth, osmotic sensitivity, conidia germination and sporulation) and fitness *ex vivo* (aggressiveness in petals and fruits) were determined and compared among the phenotypes found. The results showed a frequency of isolates resistant to TM, TEB and AZO of 41, 33 and 26%, respectively. The frequencies of LR and HR isolates for MBCs were 26% and 7% with mean EC<sub>50</sub> of 1,863 µg.mL<sup>-1</sup> and >1000 µg.mL<sup>-1</sup>, respectively. Propiconazole and prothioconazole resistant isolates showed frequency of occurrence below 8%. A mean EC<sub>50</sub> for difenoconazole, propiconazole and prothioconazole was 0.07, 0.05 and 0.03 µg.mL<sup>-1</sup>, respectively. On the other hand, TEBs isolates presented mean EC<sub>50</sub> of 0.059 µg/mL whereas TEB<sub>R</sub> showed mean values of 0.90 µg/mL. None of the isolates was considered resistant to Qol pyraclostrobin. The EC<sub>50</sub> of AZO<sub>S</sub> isolates was <0.2 µg/mL while AZO<sub>R</sub> isolates showed EC<sub>50</sub> between 0.47 and 1.280 µg/mL. Eight different phenotypes were identified in our population, the most frequent being TF<sub>S</sub>TEB<sub>S</sub>AZO<sub>S</sub> (33.3%), TF<sub>S</sub>TEB<sub>R</sub>AZO<sub>R</sub> (21.6%) and TF<sub>R</sub>TEB<sub>S</sub>AZO<sub>S</sub> (19.61%). In addition, the most resistant phenotypes exhibited mycelial growth, conidia production, conidia germination and *ex vivo* aggressiveness greater than or equal to the full sensitive phenotype (TF<sub>S</sub>TEB<sub>S</sub>AZO<sub>S</sub>). The essays on inoculated fruits treated with fungicides confirm most of phenotypes previously classified *in vitro*.

**Key words:** Peach; Brown rot; Fungicide Sensitivity; Chemical Control; Aggressiveness

#### 4.1 INTRODUÇÃO

A podridão-parda causada por *Monilinia fructicola* (G. Wint.) Honey é economicamente a doença mais importante do pessegueiro (*Prunus persica* L. Batsch). Além dos sintomas de podridão em frutos pré e pós-colheita, o patógeno pode causar cancro nos ramos e queima de pétalas (MAY DE MIO et al., 2014). O controle dessa doença tem sido realizado principalmente por aplicações de fungicidas dos grupos Metil Benzimidazóis Carbamatos (MBC's- carbendazim, tiofanato-metílico), Inibidores da Desmetilação C14 (IDM- tebuconazol, difenoconazol) e Inibidores da Quinona externa (IQe's – azoxistrobina, piraclostrobina) em misturas ou rotações em pomares comerciais de pêssego durante a safra (LICHTENBERG et al., 2016a; MAY DE MIO; LUO; MICHAILIDES, 2011).

Os MBC's foram os primeiros fungicidas sistêmicos a serem lançados e amplamente utilizados para o controle de *M. fructicola* (MA; YOSHIMURA; MICHAILIDES, 2003). Contudo os MBC's tiveram sua eficiência comprometida, devido a seleção de isolados resistentes em diversos países (SANOAMUANG; GAUNT 1995; LIM et al., 2006; MAY DE MIO; LUO; MICHAILIDES, 2011; MARTINI et al., 2016). Com esse advento, os MBC's, foram substituídos pelos IDM's no início dos anos 80, sendo o tebuconazol o IDM mais utilizado para controlar a podridão-parda no Brasil (SILVA et al., 2011). A partir de 2000, os fungicidas IQe's, uma classe de inibidores da respiração fúngica, foram registrados para o pessegueiro e são recomendados como parte do programa de manejo da doença para uso em rotação com IDM's (MAY DE MIO; LUO; MICHAILIDES, 2011). No país, os produtores de pêssegos vêm utilizando os ingredientes ativos azoxistrobina e piraclostrobina para o controle da ferrugem (*Tranzschelia discolor*) e na prevenção da podridão-parda (LICHTENBERG et al., 2016a). Além disso, alguns produtores ainda utilizam o tiofanato-metílico pelo menos duas vezes durante a mesma safra (MAY DE MIO; LUO; MICHAILIDES, 2011).

O uso contínuo dos grupos MBC's, IDM's e IQe's para o controle de *M. fructicola* têm resultado na seleção de isolados resistentes ou com sensibilidade reduzida a esses produtos em vários países (SCHNABEL et al., 2004; MAY DE MIO et al., 2011; VILLANI e COX, 2011; CHEN et al., 2012). Nos EUA, a resistência ao

IDM's foi relatada pela primeira vez em 2004 na Geórgia (SCHNABEL et al., 2004), sendo detectada posteriormente em diversas regiões (LUO et al., 2008; BURNETT; LALANCETTE; MCFARLAND, 2010; VILLANI; COX, 2011; CHEN et al., 2013). No Brasil, já houve relatos da resistência de *M. fructicola* aos IDM's (MAY DE MIO; LUO; MICHAILIDES, 2011; LICHTENBERG et al., 2014, 2017), aos MBC's (MAY DE MIO; LUO; MICHAILIDES, 2011) e redução de sensibilidade aos IQe's (PEREIRA et al., 2017).

O uso simultâneo desses três grupos de fungicidas para o manejo da podridão-parda no Brasil pode acarretar na seleção de isolados múltiplos resistentes a esses fungicidas. Entretanto, não há estudos avaliando a ocorrência de isolados brasileiros de *M. fructicola* com múltipla resistência para comprovar tal hipótese. A resistência múltipla (dupla ou tripla resistência) aos IDM's, IQe's e MBC's já foi observada anteriormente em isolados de *M. fructicola* em outros países (CHEN; LIU, SCHNABEL, 2013; CHEN; SHANG; WANG, 2014; EGUEN; MELGAREJO; DE CAL, 2015). Contudo, há uma lacuna de informações sobre a adaptabilidade parasítica de isolados múltiplos resistentes a esses fungicidas.

Mutações que levam à resistência podem melhorar a capacidade do patógeno sobreviver na presença dos fungicidas, por outro lado, essas mutações podem afetar a adaptabilidade do patógeno, ou seja, podem comprometer a capacidade de infectar, reproduzir ou competir na presença de outro organismo. As aplicações de fungicidas em populações de fungos com alta resistência e boa adaptabilidade parasítica podem comprometer o controle da doença (BRENT; HOLLOMON, 1998). Dessa maneira, a determinação da adaptabilidade torna-se imprescindível para implementar estratégias efetivas de controle da doença em áreas já estabelecidas com isolados de *M. fructicola* resistentes ao IQe's, IDM's e MBC's.

Além disso, é importante determinar a resistência prática dos isolados múltiplos resistentes aos fungicidas, pois nem sempre a detecção da resistência ou redução da sensibilidade de fungos à fungicidas observada em laboratório podem estar relacionada com as falhas de controle no campo. A "resistência prática" é um termo utilizado para expressar a observável perda de controle da doença no campo (GHINI; KIMATI, 2000; BRENT; HOLLOMON, 2007) e pode ser confirmada em plantas ou em frutos tratados com a concentração do fungicida recomendada para o produtor.

Considerando os problemas apontados anteriormente, os objetivos deste trabalho foram: (a) estudar a sensibilidade e investigar a resistência múltipla de

isolados de *M. fructicola* aos fungicidas MBC's, IQe's e IDM's; (b) determinar a adaptabilidade *in vivo* e *ex vivo* dos isolados com diferentes fenótipos de resistência e, (c) verificar a ocorrência da resistência prática dos diferentes fenótipos em frutos tratados com os fungicidas.



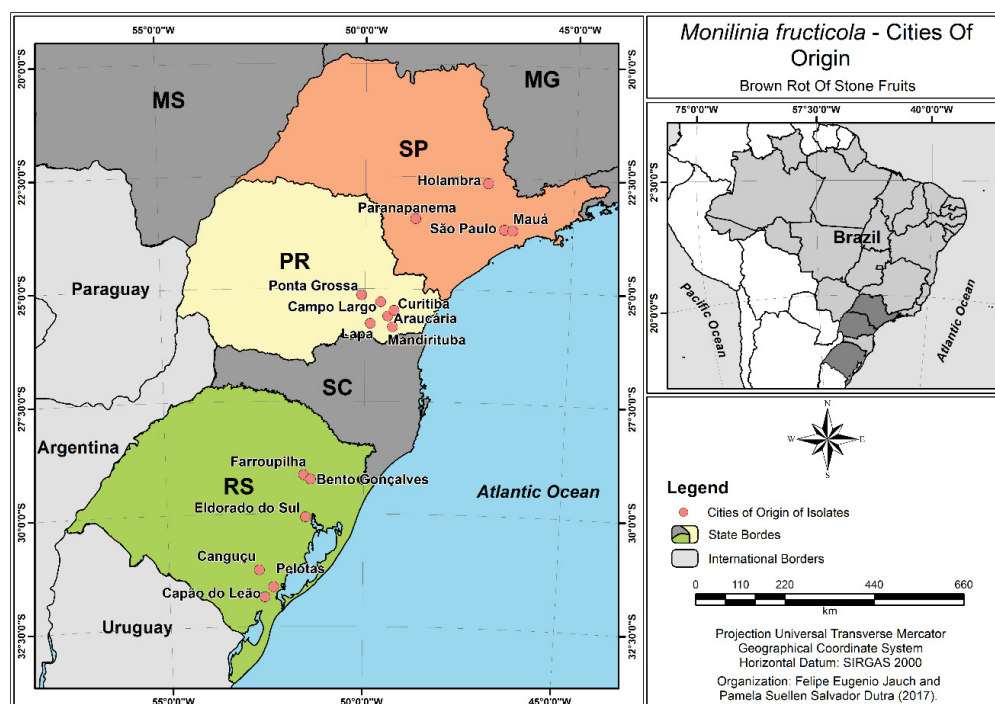
## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1 Obtenção dos isolados

Foram utilizados 53 isolados de *M. fructicola* oriundos da coleção histórica pertencente ao Laboratório de Epidemiologia para Manejo Integrado de Doenças (LEMID) da Universidade Federal do Paraná. A coleção foi proveniente de flores e frutos (incluindo frutos mumificados) de pomares comerciais de pêssego e nectarinas, coletados nos estados de São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul, entre os anos de 2002 à 2017 (TABELA 5). Os isolados até a safra de 2010 são monospóricos enquanto que os isolados das safras posteriores (2015 e 2017) foram obtidos a partir do crescimento de ponta de hifa. Os municípios de coleta dos isolados de cada estado estão indicados na FIGURA 3.

Antes da realização dos ensaios, os isolados encontravam-se preservados em glicerol (isolados da safra 2003 a 2008), água destilada esterilizada (2009 e 2010), e papel filtro (2015 e 2017) e foram reativados em meio de batata-dextrose-água (BDA) (Hi Media Laboratories®, Mumbai) e posteriormente incubados em BOD durante dez dias a 23°C.

**FIGURA 3 - MUNICÍPIOS DE COLETAS DOS ISOLADOS DE *Monilinia fructicola*.**





**TABELA 5 – IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS DE *M. fructicola* E INFORMAÇÕES DA ORIGEM DE COLETA (ANO, ESTADO, CULTIVAR E PARTE DA PLANTA)**

Isolado	Origem			
	Ano	<sup>1</sup> Estado	Cultivar	Parte da planta
100	2002	PR	Chimarrita	Fruto
115	2003	RS	Chimarrita	Fruto
181	2007	PR	Premier	Flor
190	2008	PR	Chimarrita	Flor
213	2006	SP	Marli	Fruto
311	2008	RS	Chimarrita	Múmia
317	2007	SP	Dourado	Fruto
321	2007	SP	Dourado	Fruto
335	2008	RS	Jubileu	Fruto
340	2008	SP	Tropic	Fruto
342	2008	SP	Aurora	Múmia
343	2008	SP	Sunraycer	Múmia
345	2008	SP	Tropic	Múmia
400	2005	RS	Chimarrita	Múmia
638	2009	PR	Marli	Fruto
639	2009	PR	Marli	Fruto
802	2009	SP	Desconhecido	Múmia
807	2009	SP	Desconhecido	Múmia
839	2008	SP	Desconhecido	Múmia
945	2009	SP	Desconhecido	Múmia
951	2009	SP	Desconhecido	Múmia
960	2010	RS	Maciel	Fruto
969	2010	RS	Chimarrita	Fruto
977	2010	RS	Marli	Fruto
996	2010	RS	Chimarrita	Fruto
1020	2010	RS	Desconhecido	Múmia
1023	2010	PR	Desconhecido	Múmia
1069	2010	PR	Desconhecido	Múmia
1099	2010	SP	Desconhecido	Múmia
A31	2015	PR	Chimarrita	Múmia
A58	2015	PR	Chimarrita	Múmia
A64	2015	PR	Chimarrita	Múmia
A72	2015	PR	Chimarrita	Múmia
C3	2015	SP	Dourado	Múmia
C24	2015	SP	Dourado	Múmia
C25	2015	SP	Dourado	Múmia
C26	2015	SP	Dourado	Múmia
C64	2015	SP	Dourado	Múmia
C66	2015	SP	Dourado	Múmia
CL5	2015	PR	Desconhecido	Múmia
CL15	2015	PR	Desconhecido	Múmia
CL25	2015	PR	Desconhecido	Múmia
CL26	2015	PR	Desconhecido	Múmia
CL27	2015	PR	Desconhecido	Múmia
CL43	2015	PR	Desconhecido	Múmia
CL45	2015	PR	Desconhecido	Múmia
S43	2015	PR	Desconhecido	Múmia
S25	2015	SP	Rubimel	Múmia
S28	2015	SP	Rubimel	Múmia
S35	2015	SP	Rubimel	Múmia
S37	2015	SP	Rubimel	Múmia
S43	2015	SP	Rubimel	Múmia
S48	2015	SP	Rubimel	Múmia

<sup>1</sup> SP= São Paulo; PR=Paraná; RS=Rio Grande do Sul

#### 4.2.2 Avaliação da sensibilidade *in vitro* de *M. fructicola* aos IDM's, IQe's, MBC's e classificação dos fenótipos de resistência

##### I. Doses discriminatórias:

Para separar os isolados em fenótipos sensíveis (S) e resistentes (R) foram utilizadas doses discriminatórias de 1,0 e 500 µg/mL para os produtos dos grupos dos MBC's (tiofanato-metílico e carbendazim), 0,3 µl.mL<sup>-1</sup> para os produtos IDM's (tebuconazol, difenoconazol, propiconazol e protioconazol), 1 µg/mL para o fungicida azoxistrobina e 0,1 µl.mL<sup>-1</sup> para os outros fungicidas IQe's (piraclostrobina e picoxistrobina) (TABELA 6).

Para os fungicidas do grupo dos IDM's, os isolados que obtiveram crescimento micelial de pelo menos 20% em relação a testemunha (< 80% de inibição) foram considerados resistentes (COX; BRYSON; SCHNABEL, 2007; LUO et al., 2008). Para os IQe's, os isolados resistentes foram aqueles com a percentagem de inibição da germinação menor que 50% (CHEN et al., 2013). Já para os MBC's, os isolados resistentes foram aqueles com crescimento micelial visível nas doses discriminatórias. Ainda para os MBC's, os isolados foram classificados como sensíveis (S), moderadamente resistentes (LR) e altamente resistentes (HR) (FISCHER, 2015, no prelo; MAY DE MIO et al., 2011).

A partir desses resultados, foi realizada a classificação dos fenótipos de *M. fructicola*, relacionando os padrões de resistência obtidos para tiofanato-metílico (TF), tebuconazol (TEB) e azoxistrobina (AZO).

O método do crescimento micelial em meio de cultivo acrescido com o fungicida foi utilizado nos ensaios com os fungicidas IDM's e MBC's para avaliar a sensibilidade dos isolados. Para isso, soluções estoques obtidas a partir de cada fungicida foram adicionadas no meio BDA, aquecido a 45°C, para obtenção das concentrações descritas na TABELA 6. Placas com meio BDA sem adição do fungicida foram utilizadas como controle. Após solidificação do meio, discos de micélio de cada isolado foram transferidos para o meio de cultura. Discos de quatro diferentes isolados foram depositados aleatoriamente em cada placa de Petri, em que, três repetições por isolados (em placas distintas) foram consideradas. As placas foram incubadas em BOD a 23°C com fotoperíodo de 12 horas durante sete dias. Posteriormente, foi

mensurado o diâmetro da colônia (Dc) com o auxílio de um paquímetro para obtenção da percentagem de inibição do crescimento micelial (%ICM).

**TABELA 6 - INFORMAÇÕES SOBRE OS FUNGICIDAS E METODOLOGIAS UTILIZADAS PARA AVALIAR A SENSIBILIDADE DE *Monilinia fructicola* UTILIZANDO DOSES DISCRIMINATÓRIAS.**

<sup>a</sup> Grupo de fungicida	Ingrediente ativo	Dose discriminatória	Metodologia	Referência
<b>MBC</b>	<sup>1</sup> Tiofanato-metílico	1 e 500 µg.mL <sup>-1</sup>	Crescimento micelial (BDA)	May De Mio et al (2011) Fischer (2015)
	<sup>2</sup> Carbedazim			
<b>IDM</b>	<sup>3</sup> Tebuconazol	0,3 µg.mL <sup>-1</sup>	Crescimento micelial (BDA)	Luo et al (2008) Cox, Bryson e Schnabel (2007)
	<sup>4</sup> Difenoconazol			
	<sup>5</sup> Propiconazol			
	<sup>6</sup> Protiocanazol			
<b>IQe</b>	<sup>7</sup> Azoxistrobina	1 µg.mL <sup>-1</sup>	Germinação de conídios (AA)	May De Mio et al (2011) Chen et al (2013)
	<sup>8</sup> Piraclostrobina	0,1 µg.mL <sup>-1</sup>		
	<sup>9</sup> Picoxistrobina	0,1 µg.mL <sup>-1</sup>		

<sup>a</sup> MBC= Metil benzimidazole Carbamato; IDM= Inibidores Desmetilação C14; IQe= Inibidores da Quinona externa; <sup>1</sup> Cercobin 700 WP® (70% i.a, Iharabras S.A); <sup>2</sup> Carbomax 500EC® (50% i.a, Nufarm S.A); <sup>3</sup> Folicur 250EC® (21,3% i.a, Bayer S.A) <sup>4</sup>Score 250EC® (25% i.a, Syngenta Ltda); <sup>5</sup>Tilt® (25% i.a, Syngenta Ltda); <sup>6</sup>Proline® (27% i.a, Bayer S.A); <sup>6</sup>Amistar WG® (50% i.a, Syngenta Ltda); <sup>8</sup>Comet® (25% i.a, Basf S.A) <sup>9</sup>Oranis® (25% i.a, Dupont S.A)

O método da germinação de esporos em meio de cultivo acrescido com fungicida foi utilizado para os IQe's. Os fungicidas foram adicionados em meio AA nas concentrações descrita na TABELA 6. Foi adicionado 100µg/mL de ácido salicilhidroxâmico (SHAM- Sigma-Aldrich®) nos meios AA com e sem fungicida, visando suprimir a via alternativa de respiração fúngica (via AOX), a qual poderia interferir na atividade de estrobilurinas *in vitro*. O SHAM foi dissolvido em metanol 100% na concentração de 100mg/mL. Posteriormente, suspensões de conídios foram obtidas a partir de lesões de sete dias em pêssegos em conserva previamente inoculados com os isolados de *M. fructicola*. As suspensões foram calibradas com auxílio de um hemacitômetro em 10<sup>5</sup> esporos/mL. Uma alíquota de 100µL de cada suspensão foram transferidas e espalhadas com alça de Drigalski para placas contendo meio ágar-água 20% - AA (com e sem fungicida). As placas foram incubadas a 23°C no escuro, e após 18 horas, a germinação foi paralisada com lactoglicerol. A percentagem de germinação de conídios foi determinada em microscópio de luz, examinando-se 100 conídios por placa. Foram considerados germinados os conídios que apresentavam tubo germinativo com comprimento de

pelo menos 1,5 vezes maior que comprimento do conídio. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com três repetições por isolado.

## II. Determinação da EC<sub>50</sub>:

A determinação da sensibilidade de *M. fructicola* aos fungicidas foi realizada seguindo duas metodologias distintas.

### i. Metodologia convencional: germinação de conídios em meio AA

Os fungicidas IQe's (azoxistrobina, piraclostrobina e picoxistrobina) foram adicionados no meio AA nas concentrações 0; 0,05; 0,01; 0,5; 1; 2; 4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Os meios AA foram acrescidos com SHAM na concentração de 0,1 mg. L<sup>-1</sup>. A germinação de esporos foi estimada a partir da metodologia utilizada anteriormente. Os valores EC<sub>50</sub> foram estimados para cada isolado a partir de regressões lineares simples entre os valores de percentagem de inibição da germinação de esporos (%IGC) e das concentrações de fungicida transformada em log<sub>10</sub>, onde o coeficiente de regressão foi significativo em  $P < 0,05$ . O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com três repetições.

### ii. Método da diluição em gradiente espiral (*do inglês spiral grade dilution*- SGD)

A sensibilidade do crescimento micelial de *M. fructicola* ao tebuconazol, difenoconazol, propiconazol, protioconazol e tiofanato-metílico foi determinada através da metodologia *Spiral gradiente dilution method* (AMIRI; HEATH; PERES, 2013). As características de cada fungicida e faixa de concentrações encontram-se na TABELA 7.

Esporos de *M. fructicola* foram produzidos em pêssegos em conserva previamente inoculados com um disco de micélio de cinco milímetros de diâmetro de cada isolado. Após sete dias, os esporos foram coletados a partir das lesões com auxílio de uma haste metálica e adicionados em água esterilizada para obtenção de uma suspensão ajustada de 10<sup>6</sup> esporos/mL. Para produzir as tiras de micélio, 50 mL de meio BDA acrescidas de 7 g/L de ágar foram adicionadas em placas de poliestireno de 150 mm de diâmetro. Um mililitro da suspensão de esporos de cada isolado foi adicionado sobre o meio e espalhado com auxílio de uma alça de Drigalski. As placas de Petri foram incubadas a 23°C com fotoperíodo de 12 horas durante 3 dias. As tiras

de micélio foram cortadas em dimensões específicas (90 x 6 mm) requeridas pelo *spiral gradient dilution method*.

**TABELA 7** - INFORMAÇÕES DOS FUNGICIDAS UTILIZADOS PARA DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE de *Monilinia fruticola* AOS INIBIDORES DA DESMETILAÇÃO C14 (IDM'S) E METIL BENZIMIDAZÓIS CARBAMATOS (MBC'S)

Ingrediente ativo	<sup>1</sup> Produto comercial	Grupo (FRAC)	<sup>2</sup> Solução estoque (µg/mL)	Intervalo concentração i.a (µg/mL)
Tebuconazol	Folicur 250EC®	IDM	347,62	0,02 - 2,72
Difenoconazol	Score 250EC®	IDM	149,23	0,006 - 1,020
Propiconazol	Tilt®	IDM	88,01	0,004 - 0,611
Protioconazol	Proline®	IDM	88,01	0,004 - 0,611
Tiofanato-metílico	Cercobin 700 WP®	MBC	1760,10	0,082 - 12,210

<sup>1</sup> Cercobin 700 WP® (70% i.a, Iharabras S.A); Folicur 250EC® (21,3% i.a, Bayer S.A); Score 250EC® (25% i.a, Syngenta Ltda); Tilt® (25% i.a, Syngenta Ltda); Proline® (27% i.a, Bayer S.A).

<sup>2</sup> Solução estoque calculada pelo *Spiral Gradient Endpoint* (SGE)

Para os experimentos com os fungicidas, foram colocados 50 mL de BDA em placas de poliestireno (100 x 15 mm) 24 horas antes da adição dos fungicidas pelo equipamento *spiral plate* (Autoplate 500- Spiral Biotech Autoplate Spiral Plating System). Foram preparadas cinco mililitros de solução estoque para cada fungicida nas concentrações indicadas na TABELA 7. As placas contendo os fungicidas foram incubadas a temperatura ambiente durante três horas para permitir a difusão do fungicida sobre as placas.

Quatro tiras de micélio foram adicionadas perpendicularmente ao centro de cada placa (duas por isolado) contendo os fungicidas, usando o molde *SGE template* (APÊNDICE B). Esse molde fornece linhas abaixo das placas que auxiliam a posição de inserção das tiras de micélio sobre o meio com fungicida. Foram realizadas três repetições (três placas) para cada isolado e para cada fungicida. Para a testemunha (sem fungicida) foram considerados quatro isolados por placa e três repetições. Posteriormente, as placas foram incubadas a 23°C por três dias.

O crescimento micelial radial da testemunha foi mensurado em centímetros (a partir da beirada das tiras) e a média das três repetições foi dividida por dois para representar 50% do crescimento micelial. Esse valor foi considerado referência nos tratamentos com os fungicidas para a localização do ponto onde o crescimento radial se equivalia ao valor de 50% do crescimento micelial da testemunha. Esse ponto foi delimitado com um marcador, e posteriormente a distância entre o ponto denotado até o centro da placa foi mensurada. Os dados foram submetidos ao software SGE, o qual

quantifica o valor da  $EC_{50}$  a partir da distância em milímetros determinada anteriormente.

#### 4.2.3 Determinação dos componentes de adaptabilidade (*fitness*) de diferentes fenótipos de *M. fructicola*

Foram utilizados 18 isolados de *M. fructicola* com diferentes fenótipos para a caracterização da adaptabilidade (TABELA 8). Os fenótipos foram avaliados quanto à sua adaptabilidade *ex vivo* e *in vivo*. Os seguintes parâmetros de adaptabilidade foram determinados: (i) crescimento micelial (ii) produção de conídios (iii) germinação dos conídios, (iv) sensibilidade osmótica, (v) agressividade em pétalas e (iv) agressividade em frutos.

**TABELA 8** - INFORMAÇÕES DOS ISOLADOS DE *Monilinia fructicola* SELECIONADOS PARA OS ENSAIOS DE ADAPTABILIDADE

Isolados	Origem (estado)	Ano de isolamento	Informação genótipo <sup>1</sup>	Referência
115	RS	2003	<sup>(a)</sup> TF <sub>S</sub>	Fischer (2015) <sup>2</sup>
1099	SP	2010	<sup>(b)</sup> TEB <sub>S</sub>	Lichhtemberg et al. (2017)
181	PR	2007	<sup>(a)</sup> TF <sub>R</sub>	Fischer (2015) <sup>2</sup>
977	RS	2010	<sup>(a)</sup> TF <sub>R</sub>	Fischer (2015) <sup>2</sup>
1023	PR	2010	<sup>(b)</sup> TEB <sub>S</sub>	Lichhtemberg et al. (2017)
317	SP	2007	<sup>(c)</sup> TEB <sub>R</sub> <sup>(d)</sup> AZO <sub>S</sub>	May de Mio et al (2011), Pereira et al (2017)
CL15	PR	2015	-	-
969	RS	2010	<sup>(a)</sup> TF <sub>R</sub>	Fischer (2015) <sup>2</sup>
SP09839	SP	2009	<sup>(d)</sup> AZO <sub>S</sub>	Primiano (2015), Pereira et al (2017)
343	SP	2008	<sup>(c)</sup> TEB <sub>R</sub> <sup>(d)</sup> AZO <sub>S</sub>	May de Mio et al (2011), Pereira et al (2017)
807	SP	2009	<sup>(b)</sup> TEB <sub>R</sub>	Lichhtemberg et al. (2017)
951	SP	2019	<sup>(b)</sup> TEB <sub>R</sub> <sup>(d)</sup> AZO <sub>S</sub>	Lichhtemberg et al. (2017)
C25	SP	2015	-	-
C24	SP	2015	<sup>(b)</sup> TEB <sub>S</sub>	Lichhtemberg (2017)
A64	PR	2015	-	-
C66	SP	2015	<sup>(b)</sup> TEB <sub>S</sub>	Lichhtemberg et al. (2017)
S28	SP	2015	-	-
S28	SP	2015	<sup>(b)</sup> TEB <sub>R</sub>	Lichhtemberg et al. (2017)

<sup>1</sup> Genótipo obtido em estudos anteriores: (a) sequenciamento do gene *β-tubulina*; (b) Sequenciamento do gene *MfCYP51*; (c) sequenciamento do gene *cyt B*/mutações não encontradas

<sup>2</sup> Dados não publicados (em fase de elaboração)

Nos ensaios de crescimento micelial, discos de micélio de cinco milímetros de diâmetro foram obtidos das margens de colônias de sete dias de idade e transferidos para o centro de placas de Petri contendo BDA. As placas posteriormente foram incubadas a 23° C no escuro. Após cinco dias, o diâmetro da colônia foi medido perpendicularmente duas vezes obtendo-se a média das medições. Considerou-se

quatro repetições (placas) por isolado.

Para determinar a percentagem de germinação e produção de conídios, as placas foram incubadas por mais dois dias após a avaliação do crescimento micelial sob luz fluorescente constante. As suspensões de conídios foram obtidas a partir do enxaguamento das colônias com 10 mL de água destilada esterilizada, raspando-se suavemente a colônia com auxílio de uma alça de Drigalski (para facilitar a remoção dos conídios). A suspensão foi transferida para tubos de vidro de 25 mL e levados ao *vórtex* por 30 segundos. A concentração de conídios foi determinada com auxílio de um hemacitômetro e a produção média de conídios de três repetições foram determinadas para cada isolado. Após a determinação do número de conídios produzidos por cada isolado, foi determinada a quantidade de conídios germinados. Para isso, uma alíquota de 100 µl de cada suspensão foi espalhada em placas com meio AA. Após 18 horas, foi paralisada a germinação com lactoglicerol e a percentagem de germinação foi estimada em microscopia de luz.

Para avaliar a sensibilidade osmótica dos isolados de *M. fructicola*, discos de micélio com cinco milímetros de diâmetro retirados das bordas de colônias foram transferidos para o meio BDA acrescidos com 0, 2, 4, 6% NaCl. Após sete dias de incubação a 23° C com fotoperíodo de 12 horas, os diâmetros das colônias foram medidos. A percentagem de inibição do crescimento micelial foi obtida usando a relação  $\% \text{ ICM} = [(C - T) / C] \times 100$ , em que C refere-se ao diâmetro da colônia sem a adição de fungicida (controle) e T o diâmetro da colônia tratada com o fungicida. Considerou-se três repetições (placas) por isolado.

Para os ensaios de agressividade *ex vivo*, pétalas coletadas de flores de pessegueiro obtidas de pomares não comerciais foram destacadas e acondicionadas sobre papel filtro esterilizado em caixas do tipo *gerbox* (APÊNDICE B). Suspensões de 10 µL de cada isolado na concentração  $5 \times 10^3$  esporos/mL foram depositadas sobre o centro das pétalas. Para manutenção da umidade dentro dos *gerbox*, foram depositados pedaços de algodão umedecidos com água destilada esterilizada. Cada *gerbox* foi aclimatado em sala de crescimento a  $25 \pm 2^\circ \text{C}$  no escuro. A incidência de lesões em pétalas foi avaliada a cada doze horas. Cada *gerbox* continha dez pétalas e foram consideradas seis repetições (*gerbox*) por isolado.

A agressividade em frutos foi avaliada em pêssegos da variedade Rubimel previamente desinfestados por imersão em 70% etanol por um minuto, seguido por solução de 0,5% hipoclorito de sódio por mais um minuto e enxaguados por três vezes



em água destilada esterilizada. Antes de cada inoculação, os frutos foram feridos com auxílio de uma agulha histológica na profundidade de três milímetros. Foram depositados 40 µL de suspensão de esporos ( $2 \times 10^5$  esporos/mL) de cada isolado na superfície de cada fruto. Posteriormente, os frutos foram individualizados em recipientes plásticos contendo umidade relativa 90% e mantidos a  $\pm 25^\circ\text{C}$ . O diâmetro da lesão foi mensurado no quarto dia após inoculação utilizando-se paquímetro digital.

Todos os experimentos descritos anteriormente foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado e foram repetido duas vezes. Como não houve diferença entre o primeiro e o segundo experimento nos ensaios *ex vivo*, todos os dados foram reunidos e analisados em conjunto.

#### 4.2.4 Avaliação da resistência prática de *M. fructicola* em frutos destacados tratados com fungicidas

Esse experimento foi realizado por meio da inoculação de um isolado representante de cada fenótipo de *M. fructicola* classificados previamente pelas doses discriminatórias, em frutos sem ferimento. Pêssegos da variedade Rubimel em ponto de maturação e com diâmetro entre 45 à 53 milímetros foram desinfestados por imersão em etanol a 70% por um minuto, seguido por solução de hipoclorito de sódio 0,5% por um minuto e enxaguados por três vezes em água destilada esterilizada. Para experimento com os fungicidas, os frutos foram previamente imersos em soluções contendo os ingredientes ativos tebuconazol (Folicur 200 EC®), azoxistrobina (Amistar WG®) e tiofanato-metílico (Cercobin 700WP®) nas concentrações de 70mL i.a/100L água, 12g i.a/10L água e 70 g p.c/ 100 L água, respectivamente. Os frutos não tratados com os fungicidas foram considerados testemunha.

Após 24 horas do tratamento com os fungicidas, foi realizada a deposição de 40 µL de suspensão de esporos de cada isolado na concentração de  $2 \times 10^5$  esporos/mL na superfície de cada fruto, sempre no lado mais maduro. Os frutos foram acondicionado de forma individualizada em recipientes plásticos transparente contendo pedaços de algodão umedecidos com água destilada esterilizada para a manutenção da umidade relativa em torno de 90%.

Foi realizado o monitoramento dos frutos a cada doze horas após a inoculação,



anotando-se o tempo até o aparecimento do sintoma e dos sinais do patógeno durante quatro dias. Determinou-se então o período de incubação (PI), período latente (PL) e o diâmetro da lesão (DL). Foi considerado como PI o tempo decorrido entre a inoculação dos frutos até o aparecimento dos sintomas (lesão) em 50% dos frutos e o PL foi determinado pelo tempo decorrido entre a inoculação até o aparecimento dos sinais do patógeno em 50% dos frutos com a presença. No 4º dia, determinou-se o DL a partir de duas medições perpendiculares realizadas com o auxílio de um paquímetro.

O experimento foi repetido duas vezes e conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições (frutos) por isolado. Como não houve diferença entre o primeiro e o segundo experimento, todos os dados foram reunidos e analisados em conjunto.

A viabilidade de conídios foi conferida para cada isolado usados anteriormente nas inoculações dos frutos. Uma alíquota de 100 µL foi adicionada em meio AA e espalhada com auxílio de uma alça de Drigalski. As placas foram incubadas em BOD a 25° no escuro e após 16 horas foi paralisada a germinação espalhando-se 100 µL de lactoglicerol em cada placa. Avaliou-se a percentagem de germinação de conídios em microscópio de luz, observando-se 100 conídios por placa. Foram considerados germinados os conídios que apresentavam tubo germinativo com comprimento de pelo menos 1,5 vezes maior que o comprimento do conídio. O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado com três repetições por isolado.

#### 4.2.5 Análise estatística

Os dados dos componentes de adaptabilidade *in vitro* (crescimento micelial, produção e germinação de conídios), agressividade *ex vivo* (diâmetro da lesão em frutos) e sensibilidade aos fungicidas IDM's foram submetidos a análise de variância. Foram analisadas a homogeneidade das variâncias pelos testes de Bartlett e Levene e a normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov. As pressuposições não foram atendidas e as transformações da variável original foram realizadas de acordo com a potência ótima sugerida pelo parâmetro de transformação de Box-Cox. Como nenhuma pressuposição foi atendida mesmo com a transformação

de dados, foi então realizada uma análise não paramétrica dos dados pelo teste de comparação múltipla de Kruskal-Wallis a 5% de significância. Esse método consiste em atribuir a cada valor observado, um *rank*, sempre atribuindo o menor *rank* ao menor valor e o maior *rank*, ao maior valor. A aplicação desse teste utiliza os valores numéricos transformados em *ranks* e agrupados num só conjunto de dados (MCKIGHT; NAJAB, 2010). A comparação dos grupos é realizada por meio da média dos *ranks* (rank médio).

Para os resultados de sensibilidade osmótica foi utilizada análise de regressão não linear, seguindo-se o modelo de Michaelis-Menten modificado (ZEVIANI, 2013):

$$y = \frac{\beta_1}{1 + \left(\frac{x}{\beta_2}\right)^{\beta_3}}$$

Em que,  $\beta_1$  é o valor máximo do diâmetro da colônia (mm);  $\beta_2$  é a dose que confere metade do valor máximo e  $\beta_3$  é o parâmetro que controla a forma da função.

A área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para incidência de *M. fructicola* em pétalas foi calculada por integração trapezoidal dos valores de incidência ao longo do tempo através da equação citada por Shaner & Finney (1977):

$$AACPD = \sum_{i=1}^{n-1} \left[ \frac{Y_i + Y_{i+1}}{2} \right] (t_{i+1} + t_i)$$

Onde,

AACPD = área abaixo da curva de progresso da doença

n = número de observações

$Y_i$  = incidência da doença na i-ésima observação

$T_i$  = tempo em dias na i-ésima observação

Para comparar os tratamentos com relação aos períodos de incubação e latência (PI e PL) entre os tratamentos com os fungicidas utilizou-se a técnica análise de sobrevivência usando o pacote '*survival*' (THERNEAU, 2018). Nesse caso, adotou-se o modelo não-paramétrico através do estimador de Kaplan-Meier onde a função de sobrevivência é recalculada após cada fruto expressar sintomas/sinais. Assume-se nesse método, que as ocorrência dos eventos (sintomas/sinais) são independentes entre os frutos e, conseqüentemente, a função de sobrevivência é estimada pelo produto das probabilidades de permanecer sem o evento até o tempo t (NESI et al.,

2015). Para esse caso, a variável resposta é qualitativa dicotômica, podendo ser 1 (frutos com sintomas/sinais) ou zero (frutos sem sintomas/sinais), a variável explicativa é o tempo para ocorrência de um evento(sintomas/sinais) e os tratamentos são considerados covariáveis. O efeito das covariáveis foi estimado utilizando o modelo semiparamétrico de riscos proporcionais, ou modelo de Cox (CARVALHO et al., 2011). Como cada isolado (fenótipo) pode apresentar grande heterogeneidade individual ou diferentes fragilidades, este problema pode ser tratado com a introdução de um efeito aleatório para cada isolado, o que torna as estimativas dos efeitos das covariáveis mais consistentes (CARVALHO et al., 2011; NESI et al., 2015). Portanto, os isolados foram considerados como fatores de fragilidade.

Todas as análises foram realizadas com o *software* R versão 3.4.3 (R CORE TEAM, 2018).

### 4.3 RESULTADOS

#### 4.3.1 Avaliação da sensibilidade *in vitro* de *M. fructicola* aos IDM's, IQe's, MBC's e classificação dos fenótipos de resistência

A TABELA 9 contém as classificações dos fenótipos de *M. fructicola* obtidos através das combinações entre os padrões de resistência para o tiofanato-metílico (TF), tebuconazol (TEB) e azoxistrobina (AZO).

**TABELA 9** - PADRÃO DE RESISTÊNCIA DE ISOLADOS DE *Monilinia fructicola* AO TIOFANATO-METÍLICO, TEBUCONAZOL E AZOXISTROBINA E CLASSIFICAÇÃO DOS FENÓTIPOS.

Isolado	Tiofanato-metílico <sup>2</sup>		Tebuconazol <sup>2</sup>		Azoxistrobina <sup>3</sup>		<sup>1</sup> Fenótipo
	ICM (%) <sup>2</sup>	<sup>1</sup> Padrão de Resistência	ICM (%) <sup>2</sup>	Padrão de Resistência	IGC (%) <sup>3</sup>	Padrão de Resistência	
100	2,64	R	93	S	100	S	TFr TEBs AZOs
115	100	S	100	S	92,64	S	TFs TEBs AZOs
181	5,37	R	100	S	98,2	S	TFr TEBs AZOs
190	100	S	100	S	98,54	S	TFs TEBs AZOs
213	100	S	83,14	S	100	S	TFs TEBs AZOs
311	100	S	100	S	98,23	S	TFs TEBs AZOs
317	100	S	31,21	R	84,97	S	TFs TEBR AZOs
321	0	R	100	S	100	S	TFr TEBs AZOR
335	9,41	R	100	S	93,70	S	TFr TEBs AZOs
340	100	S	100	S	99,2	S	TFs TEBs AZOs
343	100	S	56,72	R	30,71	R	TFs TEBR AZOR
345	100	S	12	S	99,65	S	TFs TEBR AZOs
400	93,24	S	90,23	S	98,62	S	TFs TEBs AZOs
638	100	S	100	S	98,97	S	TFs TEBs AZOs
639	0	R	100	S	100	S	TFr TEBs AZOs
802	100	S	28,89	R	15,88	R	TFs TEBR AZOR
807	100	S	40	R	21,28	R	TFs TEBR AZOR
839	1,24	R	100	S	7,07	R	TFr TEBs AZOR
960	19,63	R	100	S	79,11	S	TFr TEBs AZOs
945	100	S	33,68	R	60,42	S	TFs TEBR AZOs
951	100	S	27,18	R	16,55	R	TFs TEBR AZOR
969	2,8	R	100	S	6,25	R	TFr TEBs AZOR
977	0	R	100	S	99,66	S	TFr TEBs AZOs
996	14,26	R	100	S	98,31	S	TFr TEBs AZOs
1020	100	S	100	S	98,31	S	TFs TEBs AZOs
1023	0	R	100	S	99,31	S	TFr TEBs AZOs
1069	100	S	100	S	97,95	S	TFs TEBs AZOs
1099	100	S	100	S	59,66	S	TFs TEBs AZOs

(...)

**TABELA 9** – (cont.) PADRÃO DE RESISTÊNCIA DE ISOLADOS DE *Monilinia fructicola* AO TIOFANATO-METÍLICO, TEBUCONAZOL E AZOXISTROBINA E CLASSIFICAÇÃO DOS FENÓTIPOS.

Isolado	Tiofanato metílico <sup>2</sup>		Tebuconazol <sup>2</sup>		Azoxistrobina <sup>3</sup>		Fenótipo
	ICM (%) <sup>2</sup>	<sup>1</sup> Padrão de Resistência	ICM (%) <sup>2</sup>	Padrão de Resistência	IGC (%) <sup>3</sup>	Padrão de Resistência	
100	2,64	R	93	S	100	S	TF <sub>R</sub> TEB <sub>S</sub> AZO <sub>S</sub>
A31	100	S	28,74	R	3,39	R	TF <sub>S</sub> TEB <sub>R</sub> AZO <sub>R</sub>
A64	100	S	100	S	4,38	R	TF <sub>S</sub> TEB <sub>S</sub> AZO <sub>R</sub>
A58	100	S	100	S	4,38	R	TF <sub>S</sub> TEB <sub>S</sub> AZO <sub>R</sub>
A72	0	R	100	S	91,36	S	TF <sub>R</sub> TEB <sub>S</sub> AZO <sub>S</sub>
CL5	100	S	23,53	R	3,72	R	TF <sub>S</sub> TEB <sub>R</sub> AZO <sub>R</sub>
CL15	100	S	21,25	R	53,87	S	TF <sub>S</sub> TEB <sub>R</sub> AZO <sub>S</sub>
CL26	100	S	40,9	R	89,01	S	TF <sub>S</sub> TEB <sub>R</sub> AZO <sub>S</sub>
CL27	100	S	91,61	S	99,31	S	TF <sub>S</sub> TEB <sub>S</sub> AZO <sub>S</sub>
CL43	100	S	30,69	R	68,49	S	TF <sub>S</sub> TEB <sub>R</sub> AZO <sub>S</sub>
CL45	0	R	100	S	84,75	S	TF <sub>R</sub> TEB <sub>S</sub> AZO <sub>S</sub>
C3	100	S	100	S	98,9	S	TF <sub>S</sub> TEB <sub>S</sub> AZO <sub>S</sub>
C24	0	R	40,71	R	3,18	R	TF <sub>R</sub> TEB <sub>R</sub> AZO <sub>R</sub>
C25	100	S	21	R	4,39	R	TF <sub>R</sub> TEB <sub>R</sub> AZO <sub>R</sub>
C26	100	S	100	S	98,95	S	TF <sub>S</sub> TEB <sub>S</sub> AZO <sub>S</sub>
C64	100	S	100	S	100	S	TF <sub>S</sub> TEB <sub>S</sub> AZO <sub>S</sub>
C66	0	R	74,72	R	89,00	S	TF <sub>R</sub> TEB <sub>R</sub> AZO <sub>S</sub>
S19	100	S	53,31	R	32,5	R	TF <sub>S</sub> TEB <sub>R</sub> AZO <sub>R</sub>
S25	100	S	65	R	100	S	TF <sub>S</sub> TEB <sub>R</sub> AZO <sub>S</sub>
S28	13	R	39	R	99,66	S	TF <sub>R</sub> TEB <sub>R</sub> AZO <sub>S</sub>
S35	100	S	69,19	R	7,74	R	TF <sub>S</sub> TEB <sub>R</sub> AZO <sub>R</sub>
S37	100	S	12	R	7,69	R	TF <sub>S</sub> TEB <sub>R</sub> AZO <sub>R</sub>
S43	100	S	30,75	R	94,00	S	TF <sub>S</sub> TEB <sub>R</sub> AZO <sub>S</sub>
S48	100	R	40	R	100	S	TF <sub>R</sub> TEB <sub>R</sub> AZO <sub>S</sub>

<sup>1</sup> S=sensíveis; R=resistentes; TF=tiofanato-metílico; TEB=tebuconazol; AZO=azoxistrobina.

<sup>2</sup> Percentagem de inibição do crescimento micelial em meio de cultura BDA na dose discriminatória de 1 e 0,3 µg/mL para tiofanato-metílico e tebuconazol, respectivamente.

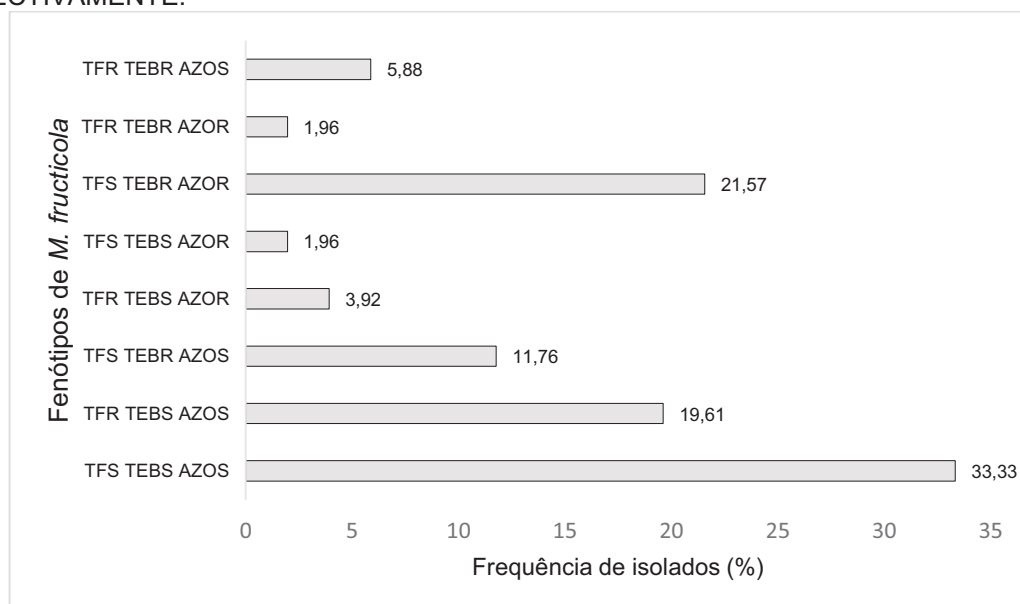
<sup>3</sup> Percentagem de inibição da germinação de conídios em meio de cultura AA na dose discriminatória de 1 µg/mL de azoxistrobina.

A população de *M. fructicola* foi subdividida em oito diferentes fenótipos, sendo eles: TF<sub>S</sub>TEB<sub>S</sub>AZO<sub>S</sub>, TF<sub>R</sub>TEB<sub>S</sub>AZO<sub>S</sub>, TF<sub>S</sub>TEB<sub>R</sub>AZO<sub>S</sub>, TF<sub>R</sub>TEB<sub>S</sub>AZO<sub>R</sub>, TF<sub>S</sub>TEB<sub>S</sub>AZO<sub>R</sub>, TF<sub>S</sub>TEB<sub>R</sub>AZO<sub>R</sub>, TF<sub>R</sub>TEB<sub>R</sub>AZO<sub>R</sub>, e TF<sub>R</sub>TEB<sub>R</sub>AZO<sub>S</sub>.

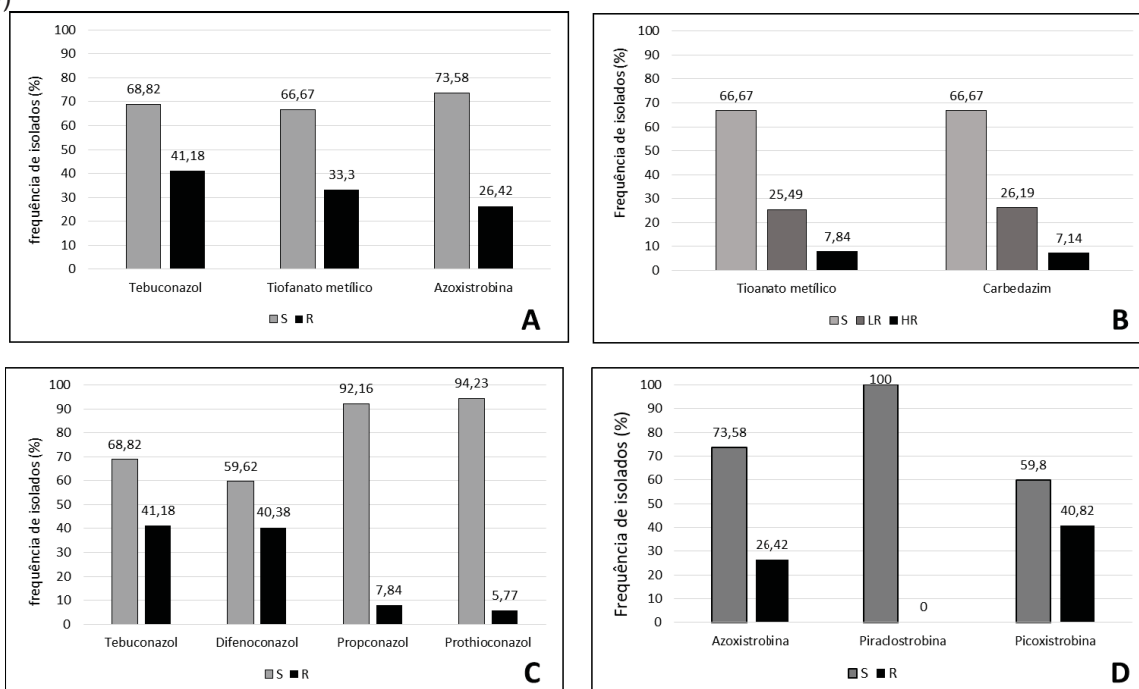
A FIGURA 4 resume a frequência de ocorrência de cada fenótipo entre os 53 isolados que foram utilizados. O grupo de isolados contendo o fenótipo TF<sub>S</sub>TEB<sub>S</sub>AZO<sub>S</sub> foi predominante na população, cuja ocorrência foi de 33,3%. Observa-se também que o segundo fenótipo predominante foi o TF<sub>S</sub>TEB<sub>R</sub>AZO<sub>R</sub> com frequência de ocorrência de 21,6%. Já os fenótipos TF<sub>R</sub>TEB<sub>R</sub>AZO<sub>R</sub> (tripla resistência) e TF<sub>S</sub>TEB<sub>S</sub>AZO<sub>R</sub> foram raramente encontrados com uma frequência de ocorrência menor que 2% dos

isolados avaliados.

**FIGURA 4-** FREQUÊNCIA DE OCORRÊNCIA DOS DIFERENTES FENÓTIPOS DE *Monilinia fructicola* ENCONTRADOS A PARTIR DE DOSES DISCRIMINATÓRIAS de 1  $\mu\text{L.mL}^{-1}$ , 0,3  $\mu\text{L.mL}^{-1}$  e 1  $\mu\text{L.mL}^{-1}$  PARA TIOFANATO-METÍLICO (TF), TEBUCONAZOL (TEB) E AZOXISTROBINA (AZO), RESPECTIVAMENTE.



**FIGURA 5-** FREQUÊNCIA DE ISOLADOS DE *Monilinia fructicola* SENSÍVEIS (S) E RESISTENTES (R) AOS FUNGICIDAS DOS GRUPOS METIL BENZIMIDAZÓIS CARBAMATOS (MBC'S) (B), INIBIDORES DA DESMETILAÇÃO C14 (IDM'S) (C) E INIBIDORES DA QUINONA EXTERNA (IQE'S) (D)



\*LR= Moderadamente resistente; HR= altamente resistente

A frequência de isolados LR aos MBC's tiofanato-metílico e carbendazim foi de 25,49% e 26,19% respectivamente. Cerca de 7% dos isolados foram considerados HR a esses dois fungicidas (FIGURA 5B). Isolados resistentes ao IDM's tebuconazol e difenoconazol apresentaram frequências de ocorrência próximas aos 40%, enquanto os outros representantes desse grupo apresentaram frequências menores que 8%. Nenhum dos isolados foram considerados resistentes à IQe piraclostrobina na dose discriminatória de 0,1  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , enquanto 26,42% e 40,82% dos isolados foram classificados como resistentes a azoxistrobina e picoxistrobina, respectivamente.

Os valores de  $\text{EC}_{50}$  para os isolados sensíveis à azoxistrobina ( $\text{AZO}_\text{S}$ ) foram menores que 0,2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Já os isolados resistentes à azoxistrobina ( $\text{AZO}_\text{R}$ ) apresentaram  $\text{EC}_{50}$  entre 0,47 a 1,280  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . O isolado 181 considerado HR ao tiofanato-metílico, apresentou  $\text{EC}_{50}$  maior que 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , enquanto os isolados LR tiveram  $\text{EC}_{50}$  média de 1,863  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Os valores de  $\text{EC}_{50}$  para o fungicida tebuconazol, variaram de <0,03 a 3,158  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , sendo que os isolados sensíveis e resistentes ao tebuconazole ( $\text{TEB}_\text{S}$  e  $\text{TEB}_\text{R}$ ) apresentaram valores médios de 0,059 e 0,90  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectivamente (TABELA 10).

**TABELA 10** - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO EFETIVA ( $\text{EC}_{50}$ ) DOS ISOLADOS DE *Monilinia fructicola* AOS FUNGICIDAS TIOFANATO-METÍLICO, TEBUCONAZOL E AZOXISTROBINA

Isolados	Fenótipo <sup>1</sup>	$\text{EC}_{50}$ ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )		
		Tiofanato metílico <sup>2</sup>	Tebuconazol <sup>2</sup>	Azoxistrobina <sup>3</sup>
115	TFs $\text{TEB}_\text{S}$ $\text{AZO}_\text{S}$	0,340	0,015	0,136
1099		<0,082	0,019	0,171
181	TFr $\text{TEB}_\text{S}$ $\text{AZO}_\text{S}$	>1000	0,044	0,165
977		2,273	0,031	0,159
1023		1,479	<0,03	0,170
317	TFs $\text{TEB}_\text{R}$ $\text{AZO}_\text{S}$	<0,082	0,462	nd
CL15		0,099	3,158	0,137
839	TFr $\text{TEB}_\text{S}$ $\text{AZO}_\text{R}$	1,838	0,169	0,897
969		nd <sup>1</sup>	0,075	nd
A64	TFs $\text{TEB}_\text{S}$ $\text{AZO}_\text{R}$	nd	0,090	1,280
343	TFs $\text{TEB}_\text{R}$ $\text{AZO}_\text{R}$	<0,082	0,486	0,519
951		<0,082	1,177	nd
807		0,144	0,101	0,546
C25		nd	0,268	0,467
S28	TFr $\text{TEB}_\text{R}$ $\text{AZO}_\text{S}$	nd	1,184	nd
C66		nd	0,809	nd
C24	TFr $\text{TEB}_\text{R}$ $\text{AZO}_\text{R}$	nd	0,452	0,489

<sup>1</sup> nd= não determinado; S= sensível; R=resistentes; TF=tiofanato-metílico; TEB=tebuconazol; AZO=azoxistrobina

<sup>2</sup> Método do diluição em gradiente espiral

<sup>3</sup> Método convencional (germinação de conídios)

Para o fungicida difenoconazol os valores variaram entre <0,006 e 0,424. Os valores médios de EC<sub>50</sub> para propiconazole e protioconazol foram de 0,05 e 0,03 µg/mL, respectivamente. Todos os valores de EC<sub>50</sub> para o tebuconazol foram relativamente superiores aos outros IDM's (TABELA 11).

Para o fungicida difenoconazol, não houve uma relação entre a classificação dos fenótipos com a EC<sub>50</sub>, pois nem sempre os menores valores de EC<sub>50</sub> foram dos isolados com padrão S.

**TABELA 11** - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO EFETIVA (EC<sub>50</sub>) DE ISOLADOS DE *Monilinia fructicola* AOS FUNGICIDAS IDM'S PELO MÉTODO DO DILUIÇÃO EM GRADIENTE ESPIRAL (AMIRI; HEATH; PERES 2013)

Isolados	EC <sub>50</sub> (µg/ml)			
	Tebuconazol	Difenoconazol	Propiconazol	Protioconazol
1023	<0,03	<0,006	<0,006	0,027
969	0,075	0,01	0,017	0,049
807	0,101	0,016	0,056	0,027
839	0,169	0,007	<0,006	0,016
C25	0,268	0,032	0,015	0,016
345	0,339	<0,006	0,035	0,017
C24	0,452	0,015	0,039	0,052
343	0,486	0,01	0,005	0,019
C66	0,809	0,023	0,163	0,054
951	1,177	0,106	0,047	0,045
CL15	3,158	0,424	0,112	0,049
<sup>1</sup> Média	0,700 a	0,07 b	0,05 b	0,03 b

<sup>1</sup> Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis (p<0,001).

#### 4.3.2 Avaliação dos fenótipos quanto aos componentes de adaptabilidade

O teste de Kruskal-Wallis evidenciou que houve diferença entre os fenótipos ( $\chi^2 < 0,05$ ) para todos os componentes de adaptabilidade avaliados. Os menores valores de D<sub>C</sub> e G<sub>C</sub> foram relacionados com o fenótipo resistente ao tebuconazol (TF<sub>S</sub>TEB<sub>R</sub>AZO<sub>S</sub>), entretanto, maior P<sub>C</sub> foi observada nesse fenótipo. Além disso, esse fenótipo não diferiu nos componentes de agressividade *ex vivo* (AACPD e D<sub>L</sub>) quando comparado ao padrão sensível (TF<sub>S</sub>TEB<sub>S</sub>AZO<sub>S</sub>) (TABELA 12).

O fenótipo com resistência tripla (TF<sub>R</sub>TEB<sub>R</sub>AZO<sub>R</sub>) apresentou menores valores para os componentes D<sub>C</sub>, P<sub>C</sub> e D<sub>L</sub> quando comparado ao fenótipo triplo sensível



(TF<sub>S</sub>TEB<sub>S</sub>AZO<sub>S</sub>), entretanto, não foi observada diferenças estatísticas na AACPD entre esses dois fenótipos. Os fenótipos TF<sub>R</sub>TEB<sub>S</sub>AZO<sub>R</sub> e TF<sub>S</sub>TEB<sub>S</sub>AZO<sub>R</sub> apresentaram menor AACPD e portanto apresentaram menor agressividade em pétalas. (TABELA 12). Os menores valores de D<sub>L</sub> foram observados nos fenótipos TF<sub>S</sub>TEB<sub>R</sub>AZO<sub>R</sub> e TF<sub>R</sub>TEB<sub>R</sub>AZO<sub>R</sub>.

**TABELA 12** - COMPARAÇÃO DOS FENÓTIPOS DE *Monilinia fructicola* QUANTO AOS COMPONENTES DE ADAPTABILIDADE *in vitro* E AGRESSIVIDADE *ex vivo*

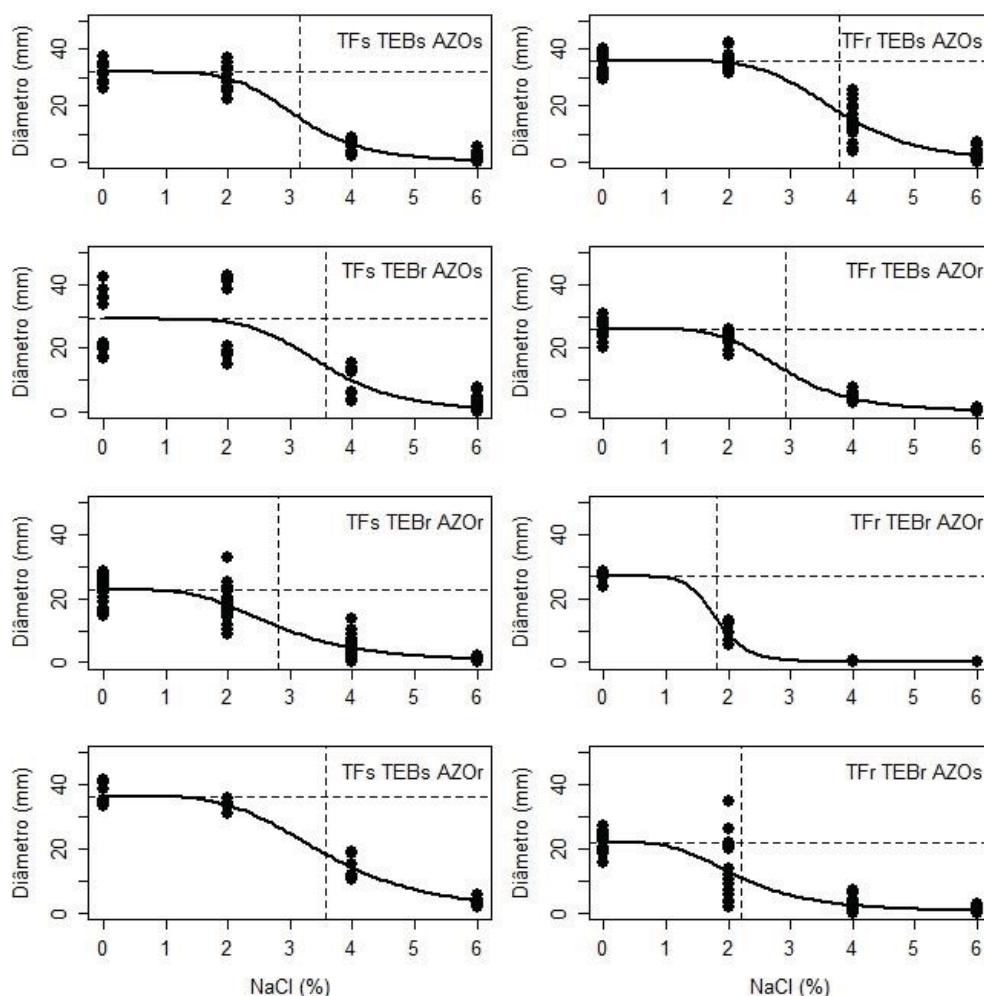
Fenótipo	<sup>1</sup> Adaptabilidade <i>in vitro</i>						<sup>1</sup> Agressividade <i>ex vivo</i>		
	D <sub>C</sub>		P <sub>C</sub>		G <sub>C</sub>		AACPD		D <sub>L</sub>
	(mm)		(10 <sup>4</sup> esporos/mm <sup>2</sup> )		(%)		(incidência em pétalas)		(mm)
TF <sub>S</sub> TEB <sub>S</sub> AZO <sub>S</sub>	47,91	a	0,049	bc	99,33	ab	2170,91	ab	51,12 a
TF <sub>R</sub> TEB <sub>S</sub> AZO <sub>S</sub>	44,56	a	0,030	cd	99,17	ab	2964,44	a	51,28 a
TF <sub>S</sub> TEB <sub>R</sub> AZO <sub>S</sub>	25,09	d	0,103	a	93,83	c	2586,67	a	49,07 ab
TF <sub>R</sub> TEB <sub>S</sub> AZO <sub>R</sub>	34,22	b	0,035	cd	99,08	ab	761,67	cd	46,4 bc
TF <sub>S</sub> TEB <sub>R</sub> AZO <sub>R</sub>	26,52	b	0,059	ab	98,33	ab	1531,11	bc	45,26 cd
TF <sub>R</sub> TEB <sub>R</sub> AZO <sub>R</sub>	26,54	cd	0,015	d	94,00	bc	3173,33	a	38,37 d
TF <sub>S</sub> TEB <sub>S</sub> AZO <sub>R</sub>	60,40	a	0,016	d	99,00	ab	400,00	d	48,31 abc
TF <sub>R</sub> TEB <sub>R</sub> AZO <sub>S</sub>	23,84	cd	0,060	bc	98,75	ab	2084,44	ab	47,69 bc

<sup>1</sup> D<sub>C</sub> é o diâmetro da colônia aos 5 dias; P<sub>C</sub> produção de conídios ao 7º dia; G<sub>C</sub> germinação de conídios em 18 horas; AACPD é a área abaixo da curva de progresso da doença e D<sub>L</sub> é o diâmetro da lesão em fruto ao quarto dia.

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de kruskal-Wallis a 5% de significância.

Observa-se na FIGURA 6 que não houve redução do crescimento micelial na dose mais baixa de NaCl (2%) em quase todos os fenótipos avaliados. O decréscimo do crescimento micelial foi verificado em todos os fenótipos com o incremento de NaCl no meio de cultura. No entanto, TF<sub>R</sub>TEB<sub>R</sub>AZO<sub>R</sub> e TF<sub>R</sub>TEB<sub>R</sub>AZO<sub>S</sub> foram os fenótipos mais afetados pelo incremento de NaCl, apresentando então, maior sensibilidade osmótica. Esse resultado é confirmado pelos menores valores de  $\beta_2$  encontrados no modelo de regressão (TABELA 13). Esse parâmetro representa a dose que confere redução da metade do valor máximo do diâmetro da colônia. Em geral, o modelo de regressão ajustou-se bem aos dados, sendo que os parâmetros  $\beta_1$  e  $\beta_2$  foram significativos para todas as curvas ajustadas ( $p < 0,001$ ) e os coeficientes de determinação ( $R^2$ ) foram maiores que 0,65.

**FIGURA 6-** CURVAS AJUSTADAS DO DIÂMETRO DA COLÔNIA (mm) NOS DIFERENTES FENÓTIPOS DE *Monilinia fructicola* PELO MODELO DE MICHAELIS-MENTEN MODIFICADO (ZEVIANI, 2013), EM FUNÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE NaCl



Bolinha cheia (●) são os valores observados; linha contínua (—) é o modelo estimado e; linha tracejada (---) são as estimativas dos parâmetros ( $\beta_1$  e  $\beta_2$ ).

**TABELA 13 -** ESTIMATIVA DOS PARÂMETROS A PARTIR DO MODELO DE MICHAELIS-MENTEN MODIFICADO (ZEVIANI, 2013) E AJUSTADO PARA O DIÂMETRO DA COLÔNIA EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NaCl PELO), INTERVALO DE CONFIANÇA DOS PARÂMETROS (95%) E COEFICIENTE DE DETERMINAÇÃO DAS CURVAS AJUSTADAS ( $R^2$ ).

Fenótipo	<sup>1</sup> Estimativa dos parâmetros			$\beta_1$		$\beta_2$		$\beta_3$		$R^2$
	$\beta_1$	$\beta_2$	$\beta_3$	$L_i$	$L_s$	$L_i$	$L_s$	$L_i$	$L_s$	
TF <sub>S</sub> TEB <sub>S</sub> AZO <sub>S</sub>	31,83	3,14	5,76	30,00	33,67	2,86	3,43	4,06	7,47	0,95
TF <sub>R</sub> TEB <sub>S</sub> AZO <sub>S</sub>	36,10	3,77	5,69	34,57	37,63	3,58	3,96	3,69	7,68	0,92
TF <sub>S</sub> TEB <sub>R</sub> AZO <sub>S</sub>	29,20	3,56	5,75 <sup>ns</sup>	24,83	33,38	2,83	4,30	-0,76	12,26	0,66
TF <sub>R</sub> TEB <sub>S</sub> AZO <sub>R</sub>	26,92	2,92	5,19	24,92	27,32	2,73	3,10	4,32	6,07	0,97
TF <sub>S</sub> TEB <sub>R</sub> AZO <sub>R</sub>	22,69	2,80	3,92	21,27	24,12	2,56	3,04	3,14	4,71	0,87
TF <sub>R</sub> TEB <sub>R</sub> AZO <sub>R</sub>	26,84	1,82	7,39 <sup>ns</sup>	25,34	28,35	1,15	2,48	-20,43	35,22	0,97
TF <sub>S</sub> TEB <sub>S</sub> AZO <sub>R</sub>	36,52	3,58	4,20	34,59	38,46	3,31	3,85	3,12	5,29	0,97
TF <sub>R</sub> TEB <sub>R</sub> AZO <sub>S</sub>	22,01	2,21	3,64	19,71	24,31	1,93	2,49	2,02	5,27	0,76

<sup>1</sup> Modelo de Michaelis-Menten modificado:  $y = (\beta_1 / (1 + (x / \beta_2)^{\beta_3}))$  onde  $\beta_1$  é o valor máximo do diâmetro da colônia (mm);  $\beta_2$  é a dose que confere metade do valor máximo e  $\beta_3$  é o parâmetro que controla a forma da função; ns= não significativo a 5 % de probabilidade;  $L_s$ =Limite superior e  $L_i$ = Limite inferior.

#### 4.3.3 Caracterização da resistência prática de *M. fructicola* em frutos destacados

Praticamente todos os fenótipos de *M. fructicola* foram capazes de expressar sintomas de podridão-parda nos frutos tratados com tiofanato-metílico e azoxistrobina, exceto o fenótipo triplo sensível, que não apresentou lesão nos frutos tratados com os diferentes fungicidas. Para os frutos tratados com tebuconazol, observa-se que não houve doença ( $D_L=0$ ) na maioria dos fenótipos testados. Os fenótipos  $TF_RTEB_RAZO_R$  (C24) e  $TF_STEB_RAZO_R$  (807) foram os únicos capazes de causar lesão em frutos tratados com tebuconazol (TABELA 14).

Observa-se que os  $D_L$  nos frutos tratados com os três fungicidas foi significativamente inferior ao dos frutos que não receberam tratamento (controle) (TABELA 14). No tratamento com tiofanato metílico, observa-se que os maiores valores de  $D_L$  são correspondentes aos fenótipos resistentes a esse fungicida. O  $D_L$  dos frutos tratados com tiofanato metílico inoculados com o fenótipo  $TF_RTEB_SAZO_S$  não diferiram dos valores de  $D_L$  nos frutos não tratados.

Comparando-se os valores entre as linhas na TABELA 14, é possível visualizar que a maioria dos fenótipos classificados previamente *in vitro* teve correspondência com os resultados de  $D_L$  expressos nos frutos tratados com os fungicidas. Por exemplo, o fenótipo triplo sensível ( $TF_STEB_SAZO_S$ ) não foi capaz de causar lesão nos frutos tratados com os três fungicidas, confirmando assim, a tripla sensibilidade. Para o teste de viabilidade de germinação, todos os isolados apresentaram germinação de esporos superior a 95%.

**TABELA 14** - DIÂMETRO DA LESÃO (mm) EM PÊSSEGOS DA CULTIVAR RUBIMEL AVALIADO NO 4º DIA APÓS INOCULAÇÃO COM *Monilinia fructicola*.

Fenótipo	Isolado	Controle	Tiofanto metílico	Tebuconazol	Azoxistrobina
$TF_STEB_SAZO_S$	115	20,45 b A	0,00 b B	0,00 b B	0,00 b B
$TF_RTEB_SAZO_S$	977	29,71 ab A	36,26 a A	0,00 b B	6,04 a B
$TF_STEB_RAZO_S$	CL15	29,01 b A	12,74 a B	0,00 b C	4,02 a B
$TF_RTEB_SAZO_R$	839	46,98 a A	29,96 ab B	0,00 b C	6,58 ab C
$TF_STEB_RAZO_R$	807	36,27 ab A	1,09 a B	3,57 a B	6,45 a B
$TF_RTEB_RAZO_R$	C24	36,58 ab A	24,09 ab B	0,53 b C	1,57 ab C
$TF_STEB_SAZO_R$	A64	31,73 ab A	0,00 ab C	0,00 b C	2,64 ab B
$TF_RTEB_RAZO_S$	S28	26,4 b A	28,46 ab A	0,00 b B	4,00 ab B

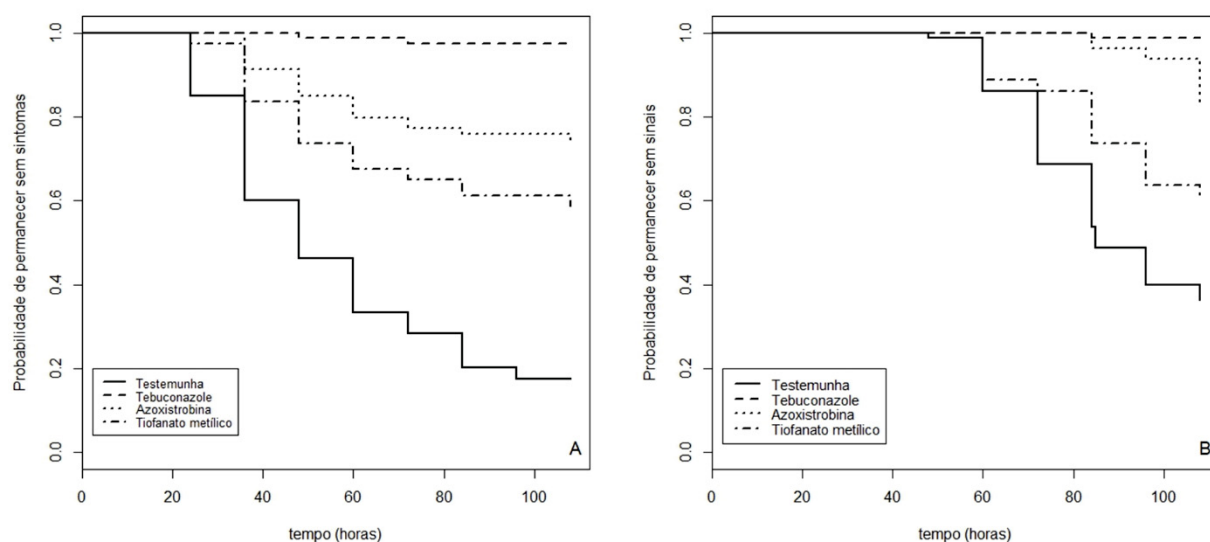
Médias seguidas da mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem significativamente pelo teste de Kruskal-Wallis ( $P<0,01$ ).

Apenas os frutos controle apresentaram PI e PL mediano estimado em 48 e 84 horas, respectivamente (TABELA 15). Os frutos tratados com os fungicidas

apresentaram menos de 50% de eventos, ou seja, o tempo mediano para PI e PL não pode ser estimado, pois menos de 50% dos frutos apresentaram sintomas ou sinais do patógeno.

A probabilidade dos frutos sem tratamento (controle) permanecerem sem sintomas cai abaixo de 0,6 a partir das 40h após inoculação com os isolados de *M. fructicola*. Para azoxistrobina e tiofanato-metílico a probabilidade de sobrevivência dos frutos se encontra entre 0,6 e 0,8 (FIGURA 7A). As estimativas são significativas pelo teste de qui-quadrado o que indica diferença entre os tratamentos para as variáveis resposta PI e PL.

**FIGURA 7-** ESTIMATIVAS DE KAPLAN-MEIER PARA AS FUNÇÕES DE SOBREVIVÊNCIA DESCREVENDO O TEMPO PARA EXPRESSÃO DOS SINTOMAS (A) E SINAIS (B) EM FRUTOS INOCULADOS COM *Monilinia fructicola*.



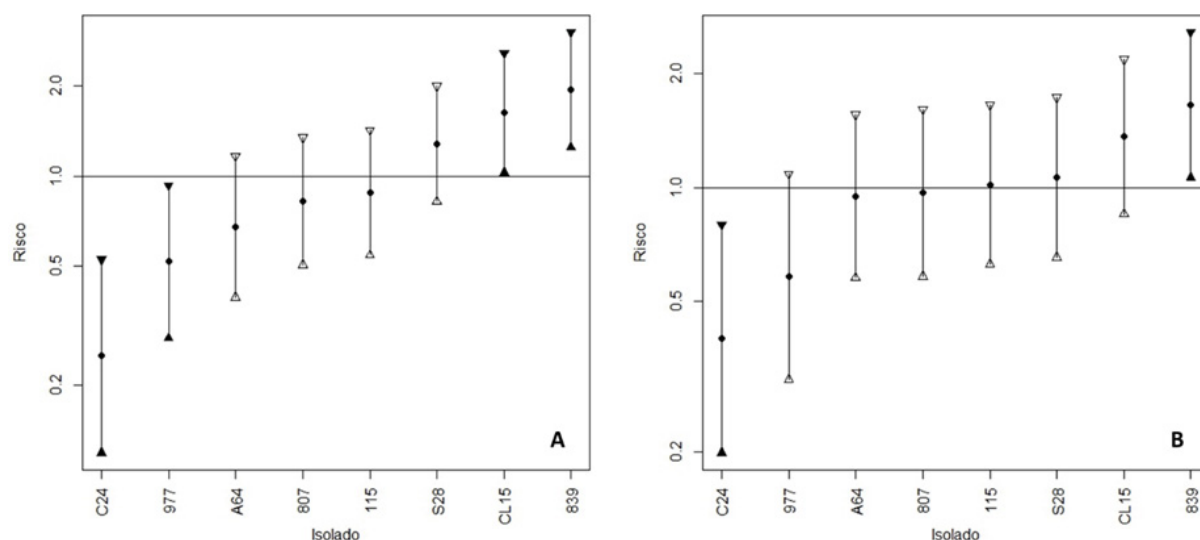
Observa-se na FIGURA 7A que a probabilidade dos frutos permanecerem sem sintomas de podridão- parda é reduzida com o tempo na testemunha e nos frutos tratados com azoxistrobina e tiofanato metílico. Nos frutos inoculados com *M. fructicola* e tratados com tebuconazol não foi observada a esporulação do patógeno e a probabilidade dos frutos permanecerem sem sinais foi próxima de 1,0. Nas 108 horas após inoculação, a probabilidade dos frutos não tratados permanecerem sem sinais foi de 0,4 (FIGURA 7B).

A FIGURA 9 mostra uma variação na estimativa da variância dos efeitos aleatórios (isolados). Os isolados C24 (TF<sub>R</sub>TEB<sub>S</sub>AZO<sub>R</sub>) e 977 (TF<sub>R</sub>TEB<sub>S</sub>AZO<sub>R</sub>) apresentam um fator de proteção para expressão de sintomas nos frutos. Observa-se que o isolado com tripla resistência (C24) foi o menos agressivo, apresentando menor

risco de causar doença e esporular em frutos sem ferimento. Em contraste, O isolado 839 (TF<sub>R</sub>TEB<sub>S</sub>AZOR<sub>R</sub>) foi o mais agressivo para expressão de sintomas e sinais do patógeno (FIGURA 8). Além disso, os demais isolados podem ser considerados equivalentes em relação ao risco de expressão de sinais nos frutos, ou seja, apresentaram-se igualmente agressivos (FIGURA 8B).

Em relação a testemunha, todos os tratamentos apresentam um fator de proteção, o qual indica a menor chance de um fruto tratado apresentar sintoma e/ou sinais em relação a testemunha. Nesse estudo, os frutos tratados com tebuconazol tem chance de apresentar sintoma e sinais de 0,01 em relação a testemunha (TABELA 15). O menor fator de proteção (a maior estimativa de risco) de um fruto apresentar sintomas de podridão-parda em relação a testemunha é representado pelo frutos tratados com tiofanato-metílico (0,283), seguido do tratamento com azoxistrobina (0,140). Nesse caso, o melhor controle da doença foi promovido nos frutos tratados com tebuconazole.

**FIGURA 8-** ESTIMATIVAS PONTUAIS DE FRAGILIDADE (ANÁLISE DE RISCO) DOS ISOLADOS DE *Monilinia fructicola* APRESENTAREM SINTOMAS (A) E SINAIS (B) EM FRUTOS E RESPECTIVOS INTERVALOS COM 95% DE CONFIANÇA



**TABELA 15** - PERÍODO DE INCUBAÇÃO E LATÊNCIA (PI E PL) E ESTIMATIVA DE RISCO PARA A EXPRESSÃO DOS SINTOMAS E SINAIS DE *Monilinia fructicola* EM FRUTOS TRATADOS COM FUNGICIDA

Tratamento	PI (horas)	Risco	PL (horas)	Risco
Testemunha	48	-	84	-
Tiofanato-metílico	-	0,283**	-	0,450**
Tebuconazole	-	0,01**	-	0,011**
Azoxistrobina	-	0,140**	-	0,145**

Estimativa de risco para expressão dos sintomas seguidas de \*\* diferem significativamente da testemunha (sem tratamento) pelo teste qui-quadrado ( $\chi^2 < 0,001$ ).

#### 4.4 DISCUSSÃO

Neste estudo, foi investigado a ocorrência da resistência múltipla aos grupos de fungicidas IDM, IQe e MBC em *M. fructicola* a partir de testes de sensibilidade *in vitro*. Com base na dose discriminatória, foram identificados oito fenótipos diferentes sendo TF<sub>S</sub>TEB<sub>S</sub>AZO<sub>S</sub> e TF<sub>S</sub>TEB<sub>R</sub>AZO<sub>R</sub> os mais recorrentes. Por outro lado, isolados resistentes apenas à azoxistrobina (TF<sub>S</sub>TEB<sub>S</sub>AZO<sub>R</sub>) raramente ocorreram na população estudada, sugerindo que a sensibilidade reduzida aos IQe's está quase sempre acompanhada da redução de sensibilidade aos IDM's.

Acreditava-se que os fungicidas IQe's poderiam ser utilizados como alternativa para o controle da podridão-parda em áreas com sensibilidade reduzida aos IDM's. Entretanto, estudos indicam que uso desses grupos em mistura podem favorecer o aparecimento de isolados com dupla resistência (LUO; SCHNABEL, 2008a). Devido à falta de alternativas, diversos produtores no mundo ainda utilizam IDM's em rotação com fungicidas IQe's, inclusive no Brasil (MAY DE MIO; LUO; MICHAILIDES, 2011; LICHTENBERG et al., 2016a). Nos EUA, as recomendações foram rotacionar IDM's com IQe's e outros inibidores da respiração, como os Inibidores da Succinato Desidrogenase (SDHI's), em aplicações pré-colheita de modo a evitar a seleção de isolados resistentes a esses grupos químicos (HORTON et al., 2010; CHEN et al., 2013). Como observado nesse estudo, é comum o aparecimento de fenótipos de *M. fructicola* duplo resistentes aos IQe's e IDM's, portanto essa estratégia talvez não seja uma boa alternativa no controle da podridão-parda. Nos EUA são recomendados fungicidas como Boscalid (SDHI's) para controle da podridão-parda (AMIRI; BRANNEN; SCHNABEL, 2010), todavia, esse ingrediente ativo não é registrado para cultura do pessegueiro no Brasil.

A ocorrência da resistência tripla aos IQe's, MBC's e IDM's é rara, porém ocorreu em um dos isolados estudados. Entretanto, o isolado triplo resistente (C24) caracterizado por doses discriminatórias no presente estudo, já teve sua base molecular caracterizada aos IDM's anteriormente por Lichtemberg et al. (2017). Os autores verificaram que esse isolado não apresentou mutação no gene *Mcyp51* sendo considerado *wild type* para os triazóis. Embora não tenha sido detectada resistência geneticamente, esse isolado apresentou uma redução da sensibilidade ao



tebuconazol. O desenvolvimento de múltipla resistência a fungicidas quimicamente não relacionados foi reportado em diferentes populações de *Botrytis cinerea* (YOURMAN et al. 2000; SUN et al., 2010, AMIRI et al. 2013) inclusive a resistência a mais de quatro fungicidas foi detectada na Alemanha e na Itália (LEROCH et al., 2013; DE MICCOLIS ANGELINI et al., 2014). Isolados de *M. fructicola* com tripla resistência aos fungicidas tiofanato-metílico, iprodiona e ciproconazol já foram detectados na Espanha, porém em baixa frequência de ocorrência (EGUEN; MELGAREJO; DE CAL, 2015).

Esses isolados com múltipla resistência podem espalhar-se para outros pomares ou emergirem de forma independente. O primeiro relato de isolados de *M. fructicola* com múltipla resistência aos MBC e IDM em foi em 2013 nos EUA. Esses isolados foram oriundos de um pomar na Pensilvânia, dois pomares em Maryland e dois pomares na Carolina do Sul, indicando que esse fenótipo poderia estar emergindo em diferentes áreas geográficas (CHEN; LIU, X; SCHNABEL, 2013), inclusive no Brasil. Nesse estudo, fenótipo com múltipla resistência a esses grupos foram detectados numa frequência menor que 6%.

Nesse trabalho, isolados resistentes ao tebuconazol ( $TEB_R$ ) ocorreram numa frequência de 41%. Os isolados  $TEB_S$  e  $TEB_R$  apresentaram valores médios de  $EC_{50}$  de 0,059 e 0,90  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. No Brasil, em estudo anterior com *M. fructicola*, maiores valores de  $EC_{50}$  para tebuconazol foram encontrados nos estados de São Paulo (0,166  $\mu\text{g/mL}$ ) em comparação com o Paraná (0,053  $\mu\text{g/mL}$ ) e Rio Grande do Sul (0,026  $\mu\text{g/mL}$ ) (LICHTENBERG et al., 2014). O valor de  $EC_{50}$  de 0,046  $\mu\text{g mL}^{-1}$  representa a *baseline* de *M. fructicola* no Brasil (MAY DE MIO et al., 2011; LICHTENBERG et al., 2016b).

Os valores de  $EC_{50}$  para propiconazol variaram entre  $< 0,006$  a 0,163  $\mu\text{g/mL}$  com média de 0,05  $\mu\text{g/mL}$ . Na Geórgia, os valores médios de  $EC_{50}$  para propiconazol de populações de *M. fructicola* estavam entre 0,021 e 0,224  $\mu\text{g/mL}$  (SCHNABEL et al., 2004). Já a *baseline* para o propiconazol foi determinada por Zehr et al. (1999) como sendo 0,03  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . O propiconazol não é registrado para cultura do pessegueiro no Brasil, e portanto, os isolados apresentaram alta sensibilidade ao produto. Contudo, o propiconazol é muito utilizado para controle da podridão-parda nos EUA (ZEHR et al., 1999; HOLB; SCHNABEL, 2007).

A frequência de isolados de *M. fructicola* resistentes ao protioconazol e propiconazol foi baixa ( $<8\%$ ). O protioconazol está incluído pelo Comitê de Ação de



Resistência a Fungicidas no grupo dos IDM's, entretanto, este fungicida não pertence ao grupo dos triazóis (FRAC, 2018). Além disso, o protioconazol interage com a enzima esterol 14 $\alpha$ -desmetilase do gene *CYP51*, de forma diferente dos outros azóis (PARKER et al. 2011), mostrando menor resistência e controle efetivo de algumas doenças em cereais. Deve-se considerar também que o protioconazol não é registrado para o controle de *M. fructicola*, e por essa razão, pode ocorrer alta sensibilidade a esse produto na maioria dos isolados utilizados nesse trabalho. A EC<sub>50</sub> média para o protioconazol foi de 0,03  $\mu$ g/mL e esse valor pode servir como referência para estudos posteriores de monitoramento de resistência, pois até o presente momento, não há informações da sensibilidade de isolados de *M. fructicola* ao protioconazol presentes na literatura. Em estudo na Escócia, o protioconazol e propiconazol se mostraram eficientes na supressão dos sintomas de *Monilinia vaccinii-corymbosi* (Reade) Honey em frutos de mirtilo (PERCIVAL; BEATON, 2012).

Os valores de EC<sub>50</sub> para os isolados AZO<sub>S</sub> foram menores que 0,2  $\mu$ g/mL e os isolados com sensibilidade reduzida (AZO<sub>R</sub>) apresentaram EC<sub>50</sub> entre 0,47 a 1,280  $\mu$ g/mL. Na China, a EC<sub>50</sub> dos isolados de *M. fructicola* sensíveis a azoxistrobina foram próximos ao relatado nesse estudo, variando de 0,02 a 1,94  $\mu$ g/mL, com um valor médio de 0,54  $\mu$ g/mL (CHEN et al., 2014). A sensibilidade inicial (*baseline*) à azoxistrobina foi relatada para populações coletadas nos Estados Unidos e no Brasil. Amiri et al (2010) determinou 0,15  $\mu$ g/mL como linha de base para *M. fructicola* nos EUA. Já May De Mio, Luo e Michailides (2011) considerou de 0,05 a 0,13  $\mu$ g/mL como referências em isolados brasileiros. A azoxistrobina e a piraclostrobina são as únicas IQe's registradas para pessegueiro no Brasil. Entretanto, todos os isolados foram considerados sensíveis à piraclostrobina nas doses discriminatórias, apontando que esse ingrediente ativo pode ser incorporado, criteriosamente, no manejo da doença como uma futura alternativa em áreas que ocorrem redução de sensibilidade à azoxistrobina.

Os isolados sensíveis ao tiofanato-metílico (S) apresentaram valores de EC<sub>50</sub> menores que 0,2  $\mu$ g/mL. O isolado 181 considerado altamente resistente (HR) ao tiofanato-metílico, apresentou EC<sub>50</sub> maior que 1000  $\mu$ g/mL, enquanto os isolados com baixa resistência (LR) tiveram EC<sub>50</sub> média de 1,863  $\mu$ g/mL. Em estudo anterior com isolados brasileiros, os isolados S apresentaram valores de EC<sub>50</sub> menores que 1,0  $\mu$ g/mL, os isolados LR apresentaram valores entre 1,99 a 12,5  $\mu$ g/mL e os HR

apresentaram valores entre 162,0 a maiores que 500 µg/mL (MAY DE MIO; LUO; MICHAILIDES, 2011).

Fenótipos com resistência aos fungicidas TF, TEB e AZO nem sempre diferiram do isolado triplo sensível quanto agressividade em pétalas e frutos, indicando que, estes podem ter o mesmo comportamento que os isolados sensível em condições de campo, e portanto, serem mais competitivos. Porém, foi possível notar que o isolado triplo resistente mostrou-se inferior em quase todos componentes de adaptabilidade quando comparado ao fenótipo triplo sensível. Além disso, o fenótipo triplo resistente exibiu maior sensibilidade osmótica, indicando que em condição de estresse, esse fenótipo geralmente não seria hábil a competir com os outros fenótipos no campo.

O fenótipo resistente ao tebuconazol (TF<sub>S</sub>TEB<sub>R</sub>AZO<sub>S</sub>) foi afetado em alguns componentes de adaptabilidade *in vitro* (D<sub>C</sub> e G<sub>C</sub>), contudo, estes foram igualmente agressivos em frutos e pétalas que o triplo sensível. A presença dos custos adaptativos associados a resistência ao propiconazol foi observada em estudo anterior, e aparentemente, a redução da adaptabilidade estava associada a superexpressão do gene devido ao elemento "Mona" perto desse gene (COX, BRYSON; SCHNABEL 2007; LUO et al., 2008). Entretanto, Chen et al. (2017) observaram que não houve custo adaptativo nos isolados resistentes aos IDM's, pois a taxa de crescimento micelial, esporulação e capacidade de causar lesões em frutos em comparação com os isolados sensíveis foram semelhantes, sugerindo que o elemento 'Mona' não afetou as atividades básicas do fungo. Na China e no Brasil o elemento 'Mona' não está relacionado à ocorrência de isolados de *M. fructicola* resistentes aos IDM's e esses isolados foram associados com mutações no gene MfCYP51 nos códon 136 (mutação Y136F) e 461 (mutação G461S), respectivamente (CHEN et al., 2012; LICHTENBERG et al., 2017). Em adição, foi relatado que os isolados de *M. fructicola* com dupla resistência ao tiofanato-metílico e propiconazole não sofreram custos adaptativos (CHEN et al., 2013). Isso indica claramente que há grandes variações na adaptabilidade de isolados resistentes aos IDM's, as quais dependem do ingrediente ativo em questão, do mecanismo de resistência e da redução da sensibilidade conjuntamente com outros fungicidas.

O fenótipo com apenas resistência ao tiofanato-metílico (TF<sub>R</sub>TEB<sub>S</sub>AZO<sub>S</sub>) não sofreu custo adaptativo, pois todos os componentes de adaptabilidade (*in vitro* e *ex vivo*) não diferiram do fenótipo triplo sensível. Já foi observado que indivíduos resistentes aos MBC's competem com os sensíveis em campo na ausência de

pressão de seleção devido à alta adaptabilidade (BEEVER et al., 1983; ELMER; GAUNT, 1993; DAMICONE; SMITH, 2009). Apesar desses graves problemas de resistência em muitos fungos fitopatogênicos, os MBC's ainda são amplamente utilizados devido ao seu amplo espectro de atividade (RUSSEL, 1995), sendo ainda utilizados para controle da podridão-parda em países como China (CHEN et., 2014) e Espanha (EGUEN, MELGAREJO; DE CAL, 2015; MAGRAMA, 2017). No Brasil, os MBC's tiofanato-metílico e carbendazim não são mais registrados para cultura do pessegueiro (AGROFIT, 2017; ADAPAR, 2017). Contudo, os produtores ainda utilizam o tiofanato-metílico pelo menos duas vezes durante a mesma safra (MAY DE MIO; LUO; MICHAILIDES, 2011), e isso pode ter grandes implicações para o manejo da doença, já que a população de isolados resistentes tende a aumentar devido à alta adaptabilidade.

O fenótipo de *M. fructicola* TF<sub>s</sub>TEB<sub>s</sub>AZOR (sensibilidade reduzida à azoxistrobina) apresentou uma menor produção de conídios e incidência em pétalas quando comparado com os isolados sensíveis. Entretanto, os outros componentes de adaptabilidade estudados (sensibilidade osmótica, D<sub>C</sub>, G<sub>C</sub> e D<sub>L</sub>) não foram prejudicados. A presença do custo adaptativo em fungos resistentes às IQu's podem variar de acordo com o patossistema e condições ambientais (FERNÁNDEZ-ORTUÑO et al., 2008). A estabilidade de isolados com sensibilidade reduzida à azoxistrobina já foi confirmada por Primiano et al. (2017). Os autores concluíram que após dez transferências consecutivas, os isolados com sensibilidade reduzida não reduziram a taxa de crescimento micelial, a produção de conídios e a sensibilidade ao fungicida. No entanto, esse comportamento contrasta com um estudo com dois isolados chineses de *M. fructicola* com baixa sensibilidade à azoxistrobina, que apresentaram resistência instável após cinco transferências (CHEN et al., 2014).

Claramente, os custos de adaptabilidade vegetativa (crescimento micelial) e reprodutiva (esporulação) associados a resistência de ascomicetos à fungicidas é altamente específica para cada espécie de fungo, à parâmetros físicos e ao fungicida em questão. Estudos anteriores mostraram que a ausência ou presença do custo adaptativo associada à resistência ao fungicida depende das espécies de fungos e das classes de fungicidas (MA; MICHAILIDES, 2004; COX, BRYSON; SCHNABEL, 2007).

Vale salientar que esse estudo foi baseado apenas em poucos isolados representantes de cada fenótipo. Pesquisas incluindo mais isolados em cada grupo

fenotípico é necessário para uma melhor caracterização da adaptabilidade. De qualquer maneira, esse trabalho mostrou que há grande variação entre as respostas de cada fenótipo nos componentes de adaptabilidade em *M. fructicola* nas condições controladas. Muitas vezes esses fenótipos podem ser favorecidos em algum processo infeccioso, o que é importante no aspecto prático, pois esses componentes poderão definir a permanência desses isolados no campo e a dificuldade no controle com esses fungicidas. Deve-se considerar também que em campo as condições ambientais são geralmente subótimas e inconstantes, e portanto, são necessários mais estudos visando determinar a habilidade competitiva de isolados resistentes e sensíveis nessas condições.

A resistência prática para isolados resistentes apenas à azoxistrobina ou ao tiofanato metílico já foram confirmadas em estudos anteriores. Frutos com ferimento e tratados com azoxistrobina inoculados com isolados resistentes de *M. fructicola* apresentaram sintomas de podridão-parda, enquanto que aqueles inoculados com isolados sensíveis não apresentaram frutos doentes (AMIRI et al., 2010; CHEN et al., 2014). Já o fungicida tiofanato-metílico na dose recomendada controlou efetivamente a doença em frutos quando inoculados com isolados sensíveis, mas não nos isolados resistentes (LEROUX et al., 2000). Entretanto, trabalhos confirmando a resistência prática de fenótipos com múltipla resistência são escassos na literatura, e até mesmo ausentes para esse patossistema.

Nesse estudo, observou-se que apenas os fenótipos TF<sub>S</sub> TEB<sub>R</sub> AZO<sub>R</sub> (isolado 807) TF<sub>R</sub> TEB<sub>R</sub> AZO<sub>R</sub> (C24) foram capazes de causar lesão nos frutos tratados com tebuconazol. Nota-se também uma redução significativa do diâmetro da lesão nos frutos tratados com azoxistrobina e tiofanato-metílico em relação aos frutos controle. Em geral, foi possível observar uma associação entre os fenótipos de resistência classificados por meio das doses discriminatórias e os resultados encontrados nos frutos tratados com os fungicidas, onde foi possível confirmar pelo menos cinco fenótipos de resistência. Contudo, esses resultados não podem ser associados a uma falha de controle da doença, já que os frutos tratados com os fungicidas apresentaram menor risco de expressão sintomas/ou sinais e redução do diâmetro da lesão, em relação a testemunha. Portanto, experimentos adicionais em campo devem ser estabelecidos para confirmar a resistência prática desses fenótipos, ou seja, a falha de controle da doença nas condições de campo.

#### 4.5 CONCLUSÕES

- Fenótipos resistentes a mais de um grupo de fungicidas foram encontrados nos isolados brasileiros de *M. fructicola*, confirmando a ocorrência da resistência múltipla entre os grupos MBC's e IQe's e IDM's.
- Houve grande variação nos componentes de adaptabilidade *in vitro* entre os fenótipos resistentes. Porém, estes fenótipos nem sempre difeririam do isolado triplo sensível nos ensaios *ex vivo*, apresentando-se igualmente agressivos em frutos e em pétalas.
- A maioria dos fenótipos de resistência classificados *in vitro* foram confirmados nos experimentos em frutos tratados com os fungicidas. Contudo, os fungicidas aplicados em frutos pós colheita foram capazes de retardar e/ou reduzir o aparecimento de sintomas da podridão parda. Dessa maneira, não foi possível confirmar a ocorrência da resistência prática.

## REFERÊNCIAS

- AGROFIT- Sistema de agrotóxicos fitossanitários. Disponível em: <[http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em 12/12/2017
- AMIRI, A.; BRANNEN, P. M.; SCHNABEL, G. Reduced sensitivity in *Monilinia fructicola* field isolates from South Carolina and Georgia to respiration inhibitor fungicides. **Plant disease**, v. 94, n. 6, p. 737-743, 2010.
- AMIRI, A.; HEATH, S. M.; PERES, N. A. Phenotypic characterization of multifungicide resistance in *Botrytis cinerea* isolates from strawberry fields in Florida. **Plant disease**, v. 97, n. 3, p. 393-401, 2013.
- BEEVER, R. E.; BRIEN, H. M. R. A survey of resistance to the dicarboximide fungicides in *Botrytis cinerea*. **New Zealand journal of agricultural research**, v. 26, n. 3, p. 391-400, 1983.
- BRENT, K. J.; HOLLOMON, D. W. Fungicide resistance: the assessment of risk. Brussels, Belgium: Global **Crop Protection Federation**, 1998.
- BURNETT, A.; LALANCETTE, N.; MCFARLAND, K. First report of the peach brown rot fungus *Monilinia fructicola* resistant to demethylation inhibitor fungicides in New Jersey. **Plant disease**, v. 94, n. 1, p. 126-126, 2010.
- CARVALHO, M.S.; ANDREOZZI, V.L.; CODECO, C.T.; CAMPOS, D.P.; BARBOSA, M.T.S.; SHIMAKURA, S.E. **Análise de sobrevida – Teoria e aplicações em saúde**. 2ª.Ed. Rio de Janeiro RJ. FIOCRUZ 432p, 2011.
- CASTELLANI, Aldo. The "water cultivation" of pathogenic fungi. **J Trop Med Hyg**, v. 66, p. 283-284, 1963.
- CHEN, F. P., FAN, J. R., ZHOU, T., LIU, X. L., LIU, J. L., & SCHNABEL, G. Baseline sensitivity of *Monilinia fructicola* from China to the DMI fungicide SYP-Z048 and analysis of DMI-resistant mutants. **Plant disease**, v. 96, n. 3, p. 416-422, 2012.
- CHEN, F.; LIU, X.; SCHNABEL, G. Field strains of *Monilinia fructicola* resistant to both MBC and DMI fungicides isolated from stone fruit orchards in the eastern United States. **Plant Disease**, v. 97, n. 8, p. 1063-1068, 2013.
- CHEN, S. N., SHANG, Y., WANG, Y., SCHNABEL, G., LIN, Y., YIN, L. F., AND LUO, C. X. Sensitivity of *Monilinia fructicola* from peach farms in China to four fungicides and characterization of isolates resistant to carbendazim and azoxystrobin. **Plant disease**, v. 98, n. 11, p. 1555-1560, 2014.
- CHEN, S., YUAN, N., SCHNABEL, G., & LUO, C. Function of the genetic element 'Mona' associated with fungicide resistance in *Monilinia fructicola*. **Molecular plant pathology**, v. 18, n. 1, p. 90-97, 2017.



COX, K. D.; BRYSON, P. K.; SCHNABEL, G. Instability of propiconazole resistance and fitness in *Monilinia fructicola*. **Phytopathology**, v. 97, n. 4, p. 448-453, 2007

DAMICONE, J. P.; SMITH, D. L. **Fungicide resistance management**. Division of Agricultural Sciences and Natural Resources, Oklahoma State University, 2009.

DE MICCOLIS ANGELINI, R. M., ROTOLO, C., MASIELLO, M., GERIN, D., POLLASTRO, S., & FARETRA, F. Occurrence of fungicide resistance in populations of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) on table grape and strawberry in southern Italy. **Pest management science**, v. 70, n. 12, p. 1785-1796, 2014.

EGÜEN, B.; MELGAREJO, P.; DE CAL, A. Sensitivity of *Monilinia fructicola* from Spanish peach orchards to thiophanate-methyl, iprodiona, and cyproconazole: fitness analysis and competitiveness. **European Journal of Plant Pathology**, v. 141, n. 4, p. 789-801, 2015.

ELMER, P. A. G.; GAUNT, R. E. Effect of frequency of dicarboximide applications on resistant populations of *Monilinia fructicola* and brown rot in New Zealand orchards. **Crop Protection**, v. 12, n. 2, p. 83-88, 1993.

FERNÁNDEZ-ORTUÑO, D., TORÉS, J. A., DE VICENTE, A., & PÉREZ-GARCÍA, A. Mechanisms of resistance to QoI fungicides in phytopathogenic fungi. **International Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 1, 2008.

FISCHER, J. M. M. **Caracterização de populações de *Monilinia fructicola* e resistência ao fungicida tiofanato metílico**. Tese (Doutorado em Genética) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2015. No prelo.

FRAC- **Fungicide Resistance Action** Committee. Disponível em: <<http://www.frac.info/>>. Acesso em: 02/01/2018.

HOLB, I. J.; SCHNABEL, G. Differential effect of triazoles on mycelial growth and disease measurements of *Monilinia fructicola* isolates with reduced sensitivity to DMI fungicides. **Crop protection**, v. 26, n. 5, p. 753-759, 2007.

HORTON, D., BRANNEN, P., BELLINGER, B., RITCHIE, D. **Southeastern peach, nectarine and plum pest management and culture guide**. 2010.

LEROUX, P.; FRITZ, R.; DEBIEU, D.; ALBERTINI, C.; LANEN, C.; BACH, J.; GREDT, M.; CHAPELAND, F. Mechanism of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea*. **Pest Management Science**, v. 58, n. 9, p. 876-888, 2002.

LEROCH, M., PLESKEN, C., WEBER, R. W., KAUFF, F., SCALLIET, G., & HAHN, M. Gray mold populations in German strawberry fields are resistant to multiple fungicides and dominated by a novel clade closely related to *Botrytis cinerea*. **Applied and environmental microbiology**, v. 79, n. 1, p. 159-167, 2013.

LICHTENBERG, P. S. F., ZEVIANI, W. M., MORALES, R. G. F., MICHAILIDES, T. J., MAY-DE-MIO, L. L. Shift in *Monilinia fructicola* sensitivity to tebuconazol fungicide, and resistance survey in Southern Brazil. In: Modern fungicides and antifungal compounds VII. Proceedings of the 17th International Reinhardtbrunn Symposium, April 21-25

2013, Friedrichroda, Germany. Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft eV Verlag, p. 173-178, 2014.

LICHTENBERG, P. S. F.; PRIMIANO, I. V.; FISCHER, J. M.; GLIENKE, C.; AMORIM, L.; MAY DE MIO, L. L. Resistência de *Monilinia* spp. aos fungicidas do grupo Inibidores da Desmetilação( DM), Inibidores da Quinona Externa (IQe) e dos Metilo Benzimidazol Carbamatos (MBC). **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 24, p. 145-173, 2016a.

LICHTENBERG, P. S., ZEVIANI, W. M., MICHAILIDES, T. J., & MAY DE MIO, L. L. Comparison of the sensitivity of *Monilinia fructicola* isolates to tebuconazol in Brazil using three methods. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 38, n. 1, p. 55-63, 2016b.

LICHTENBERG, P. S., LUO, Y., MORALES, R. G., MUEHLMANN-FISCHER, J. M., MICHAILIDES, T. J., MAY DE MIO, L. L. The Point Mutation G461S in the MfCYP51 Gene is Associated with Tebuconazol Resistance in *Monilinia fructicola* Populations in Brazil. **Phytopathology**, p. PHYTO-02-17-0050-R, 2017.

LIM, T. H., JOHNSON, I., CHA, B. Characterization and Genetic Diversity of Benzimidazole-resistant and-sensitive *Monilinia fructicola* Isolates in Korea. **Plant Pathology Journal**, v. 22, n. 4, p. 369, 2006.

LUO, C.X.; SCHNABEL, G. Adaptation to fungicides in *Monilinia fructicola* isolates with different fungicide resistance phenotypes. **Phytopathology**, v. 98, n. 2, p. 230-238, 2008a.

LUO, C. X., SCHNABEL, G. The cytochrome P450 lanosterol 14- $\alpha$  demethylase gene is a demethylation inhibitor fungicide resistance determinant in *Monilinia fructicola* field isolates from Georgia. **Appl. Environ. Microbiol.** 74:359-366, 2008b.

LUO, C.X.; COX, K. D., AMIRI, A., SCHNABEL, G. Occurrence and detection of the DMI resistance-associated genetic element 'Mona' in *Monilinia fructicola*. **Plant Disease**, v. 92, n. 7, p. 1099-1103, 2008.

MA, Z., Y.; M., MICHAILIDES, T.J. Identification and characterization of benzimidazole resistance in *Monilinia fructicola* from stone fruit orchards in California. **Appl. Environ. Microbiol.** 69, 7145–7152, 2003.

MCKIGHT, P. E.; NAJAB, J. Kruskal-Wallis Test. **Corsini encyclopedia of psychology**, 2010.

MAGRAMA- **Ministerio de Agricultura Pesca Alimentación y Medio Ambiente**. Gobierno de España. “Registro de Productos Fitosanitarios.” Disponível em: <<http://www.magrama.gob.es>> Acesso em: 10/01/2018

MARTINI, C.; GUIDARELLI, M.; DI FRANCESCO, A.; CEREDI, G.; MARI, M. Characterization of thiophanate methyl resistance in Italian *Monilinia fructicola* isolates. **Journal of Plant Pathology**. v. 98, p. 75-84, 2016.



MAY-DE MIO, L. L.; LUO, Y.; MICHAILIDES, T. J. Sensitivity of *Monilinia fructicola* from Brazil to tebuconazol, azoxystrobin, and thiophanate-methyl and implications for disease management. **Plant Disease**, v. 95, n. 7, p. 821-827, 2011.

MAY DE MIO, L.L.; GARRIDO, L.R.; UENO, B.; FARJADO, T.V.M. Doenças da cultura do pessegueiro e métodos de controle. p.355-366. In: RASEIRA, M. C.B.; PEREIRA, J. F. M.; CARVALHO, F. L. C. **Pessegueiro**, 1º Edição. Embrapa, Brasília, DF, 2014. 780p.

NESI, C. N., SHIMAKURA, S. E., RIBEIRO JUNIOR, P. J., & MIO, L. L. M. D. Survival analysis: a tool in the study of post-harvest diseases in peaches. **Revista Ceres**, v. 62, n. 1, p. 52-61, 2015.

PARKER, J. E., WARRILOW, A. G., COOLS, H. J., MARTEL, C. M., NES, W. D., FRAAIJE, B. A., KELLY, S. L. Prothioconazole binds to *Mycosphaerella graminicola* CYP51 by a different mechanism compared to other azole antifungals. **Applied and Environmental Microbiology**, 2010.

PERCIVAL, David; BEATON, Eileen. Suppression of *Monilinia* blight: strategies for today and potential fungicide options for tomorrow. **International journal of fruit science**, v. 12, n. 1-3, p. 124-134, 2012.

PEREIRA, W. V., PRIMIANO, I. V., MORALES, R. G., PERES, N. A., AMORIM, L., & MAY DE MIO, L. L. Reduced Sensitivity to Azoxystrobin of *Monilinia fructicola* Isolates From Brazilian Stone Fruits is Not Associated With Previously Described Mutations in the Cytochrome b Gene. **Plant Disease**, v. 101, n. 5, p. 766-773, 2017.

PRIMIANO, I. V. Adaptabilidade de isolados de *Monilinia fructicola* com diferentes níveis de sensibilidade à azoxistrobina. **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo, 2015.

PRIMIANO, I. V., MOLINA, J. P. E., MAY DE MIO, L. L. M. D., PERES, N. A., AMORIM, L. Reduced sensitivity to azoxystrobin is stable in *Monilinia fructicola* isolates. *Scientia Agricola*, v. 74, n. 2, p. 169-173, 2017.

R CORE TEAM: A Language and Environment for Statistical Computing, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>. Acessado em:04/02/2018

RUSSELL, P. E. Fungicide resistance: occurrence and management. **The Journal of Agricultural Science**, v. 124, n. 3, p. 317-323, 1995.

SCHNABEL, G., BRYSON, P. K., BRIDGES, W. C., BRANNEN, P. M. Reduced sensitivity in *Monilinia fructicola* to propiconazole in Georgia and implications for disease management. **Plant Dis.** 88:1000-1004, 2004.

SANOAMUANG, N.; GAUNT, R. E. Persistence and fitness of carbendazim-and dicarboximide-resistant isolates of *Monilinia fructicola* (Wint.) Honey in flowers, shoots and fruit of stone fruit. **Plant pathology**, v. 44, n. 3, p. 448-457, 1995.

SHANER, G.; FINNEY, R. E. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. **Phytopathology**, v. 67, n. 8, p. 1051-1056, 1977.

SILVA, S. J.P, KOHLS, V.K, MANICA-BERTO, R., RIGATTO, P., ROMBALDI, C. V. Apropriação tecnológica da produção integrada de pêssegos na região de Pelotas no Estado do Rio Grande do Sul. *Ciência Rural*, v. 41, n. 9, 2011.

SUN, H. Y., WANG, H. C., CHEN, Y., LI, H. X., CHEN, C. J., & ZHOU, M. G. Multiple resistance of *Botrytis cinerea* from vegetable crops to carbendazim, diethofencarb, procymidone, and pyrimethanil in China. **Plant Disease**, v. 94, n. 5, p. 551-556, 2010.

THERNEAU T. **A Package for Survival Analysis in S**. R package version 3.4.0. Disponível em: <<http://CRAN.R-project.org/package=survival>>. Acessado em: 04/02/2018.

VILLANI, S. M.; COX, K. D. Characterizing fenbuconazole and propiconazole sensitivity and prevalence of 'Mona'in isolates of *Monilinia fructicola* from New York. **Plant disease**, v. 95, n. 7, p. 828-834, 2011.

YOSHIMURA, M. A., LUO, Y., MA, Z., & MICHAILIDES, T. J. Sensitivity of *Monilinia fructicola* from stone fruit to thiophanate-methyl, iprodiona, and tebuconazol. **Plant disease**, v. 88, n. 4, p. 373-378, 2004.

YOURMAN, L. F.; JEFFERS, S. N.; DEAN, R. A. Genetic analysis of isolates of *Botrytis cinerea* sensitive and resistant to benzimidazole and dicarboximide fungicides. **Phytopathology**, v. 90, n. 8, p. 851-859, 2000.

ZEHR, E. I., LUSZCZ, L. A., OLIEN, W. C., NEWALL, W. C., & TOLER, J. E. Reduced sensitivity in *Monilinia fructicola* to propiconazole following prolonged exposure in pach orchards. **Plant disease**, v. 83, n. 10, p. 913-916, 1999.

ZEVIANI, W. M. **Parametrizações interpretáveis em modelos não lineares**. Tese de Doutorado. Tese (Doutorado). 146 p. Universidade Federal de Lavras, Lavras: UFLA, 2013.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O surgimento de populações de *Monilinia fructicola* com resistência de campo a múltiplos fungicidas, como observado nesse estudo, dificulta o levantamento de estratégias anti-resistência, já que o controle da podridão-parda depende em grande parte da rotação ou mistura de MBC, IDM e IQe. As misturas de fungicidas têm sido uma boa estratégia amplamente adotada para o manejo de resistência, no entanto, vimos que a dupla resistência foi encontrada e pode acelerar a seleção de patógenos resistentes a ambos fungicidas em mistura. Geralmente, uma boa escolha é o uso de misturas de fungicidas multi-sítios que apresentem um baixo risco de resistência (clorotalonil, mancozebe, etc.) e são altamente eficazes contra o patógeno alvo.

Além disso, verificou-se que em geral os fenótipos resistentes não exibiram custos adaptativos quando comparado ao fenótipo selvagem. Os parâmetros de adaptabilidade são fatores importantes na avaliação do risco de acumulação de populações resistentes a fungicidas no campo, porém esses componentes de adaptabilidade *in vitro* e *ex vivo* podem não refletir uma situação real no campo da concorrência entre isolados resistentes e sensíveis em populações de *M. fructicola*. Deve-se notar também que as experiências apresentadas nesse estudo foram realizadas em condições ideais para o patógeno ou em condições ambientais constantes, o que raramente ocorre no campo.

Por fim, conclui-se que o iprodiona mostrou-se uma opção promissora para inserir no manejo da doença em conjunto com as práticas culturais nos pomares, principalmente em áreas onde já estão estabelecidas populações resistentes a outros fungicidas.

## REFERÊNCIAS GERAIS

- ANDERSON, J. B. Evolution of antifungal-drug resistance: mechanisms and pathogen fitness. *Nature reviews. Microbiology*, v. 3, n. 7, p. 547, 2005.
- AGRIOS, G.N. **Plant pathology**. 5°.ed. Elsevier. San Diego. Academic Press, 2005. 922p.
- AGRIANUAL - Anuário da Agricultura Brasileira. São Paulo. Prol. 2009, 522 pg.
- AGROFIT- Sistema de agrotóxicos fitossanitários. Disponível em: <[http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em 12/1/2018.
- AMIRI, A.; BRANNEN, P. M.; SCHNABEL, G. Reduced sensitivity in *Monilinia fructicola* field isolates from South Carolina and Georgia to respiration inhibitor fungicides. **Plant disease**, v. 94, n. 6, p. 737-743, 2010.
- BARTLETT, D. W., CLOUGH, J. M., GODWIN, J. R., HALL, A. A., HAMER, M., & PARR-DOBRZANSKI, B. The strobilurin fungicides. **Pest management science**, v. 58, n. 7, p. 649-662, 2002.
- BEEVER, R. E.; BYRDE, R. J. W. Resistance to the dicarboximide fungicides. **Fungicide resistance in crop protection**, p. 101-117, 1982.
- BEEVER, R. E.; BRIEN, H. M. R. A survey of resistance to the dicarboximide fungicides in *Botrytis cinerea*. **New Zealand journal of agricultural research**, v. 26, n. 3, p. 391-400, 1983.
- BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. Epidemiologia comparativa entre os patossistemas temperado e tropical: consequências para a resistência a fungicidas. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, n. 2, p. 119-127, 2001.
- BLEICHER, J. Doenças de rosáceas de caroço (pessegueiro, ameixeira, nêspira, etc). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. **Manual de Fitopatologia**. São Paulo: Ceres, v.2, p.621-627, 1997.
- BRENT, K J., D W. HOLLOMON. Fungicide Resistance in Crop Pathogens, How Can it be Managed? FRAC Monograph No. 1 (second, revised edition), **Croplife international**. Brussels, 2007.
- BRENT, K. J.; HOLLOMON, D. W. Fungicide resistance: the assessment of risk. **Global Crop Protection Federation** Brussels, Belgium, 1998.
- BYRDE, R. J. W.; WILLETTS, H. J. **The brown rot fungi of fruit: their biology and control**. Elsevier, p. 9-11. 1977.

CARVALHO, V. L.; CHALFOUN, S. M. Doenças do Pessegueiro. In: Pessegueiro e Ameixeira. **Informe Agropecuário**, v. 18, n. 189, p. 51-55, 1997.

CASTRO, L. A. S.; BARBIERI, R.L. Botânica e morfologia do pessegueiro. In: RASEIRA, M. C.B.; PEREIRA, J. F. M.; CARVALHO, F. L. C. **Pessegueiro**, 1º Edição. Embrapa, Brasília, DF, 2014. 780 p.

CHEN, F. P., FAN, J. R., ZHOU, T., LIU, X. L., LIU, J. L., & SCHNABEL, G. Baseline sensitivity of *Monilinia fructicola* from China to the DMI fungicide SYP-Z048 and analysis of DMI-resistant mutants. **Plant disease**, v. 96, n. 3, p. 416-422, 2012.

CHEN, F.; LIU, X.; SCHNABEL, G. Field strains of *Monilinia fructicola* resistant to both MBC and DMI fungicides isolated from stone fruit orchards in the eastern United States. **Plant disease**, v. 97, n. 8, p. 1063-1068, 2013.

CHEN, S., YUAN, N., SCHNABEL, G., & LUO, C. Function of the genetic element 'Mona' associated with fungicide resistance in *Monilinia fructicola*. **Molecular plant pathology**, v. 18, n. 1, p. 90-97, 2017.

CITADIN, I. Fruteiras de caroço. **Encontro de fruticultura dos Campos Gerais**. v. 2, 2009.

COX, K. D.; BRYSON, P. K.; SCHNABEL, G. Instability of propiconazole resistance and fitness in *Monilinia fructicola*. **Phytopathology**, v. 97, n. 4, p. 448-453, 2007.

CUI, W.; BEEVER, R. E.; PARKES, S. L.; TEMPLETON, M. D. Evolution of an osmosensing histidine kinase in field strains of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) in response to dicarboximide fungicide usage. **Phytopathology**, v. 94, n. 10, p. 1129-1135, 2004.

DAMICONE, J. P.; SMITH, D. L. **Fungicide resistance management**. Division of Agricultural Sciences and Natural Resources, Oklahoma State University, 2009.

DEKKER, J. Can we estimate the fungicide-resistance hazard in the field from laboratory and greenhouse tests. **Fungicide resistance in crop protection**, p. 128-137, 1982.

EGÜEN, B.; MELGAREJO, P.; DE CAL, A. Sensitivity of *Monilinia fructicola* from Spanish peach orchards to thiophanate-methyl, iprodiona, and cyproconazole: fitness analysis and competitiveness. **European Journal of Plant Pathology**, v. 141, n. 4, p. 789-801, 2015.

EHR, R. J.; KEMMITT, G. Periodic table of the fungicides. Indianapolis: **Dow Agrosciences**, v. 1, 2002.

ELMER, P. A. G.; GAUNT, R. E. Effect of frequency of dicarboximide applications on resistant populations of *Monilinia fructicola* and brown rot in New Zealand orchards. **Crop Protection**, v. 12, n. 2, p. 83-88, 1993.

ELMER, P. A. G.; GAUNT, R. E.; FRAMPTON, C. M. Spatial and temporal characteristics of dicarboximide-resistant strains of *Monilinia fructicola* and brown rot incidence in stone fruit. **Plant pathology**, v. 47, n. 4, p. 530-536, 1998.

FACHINELLO, J. C.; PASA, M. C.; SCHMTIZ, J. D.; BETEMPS, D. L. Situação e perspectivas da fruticultura de clima temperado no Brasil. **Rev. Bras. Frutic**, Jaboticabal, v. 33, n. spe1, p. 109-120, Out. 2011.

FARETRA, F.; POLLASTRO, S. Genetic basis of resistance to benzimidazole and dicarboximide fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). **Mycological Research**, v. 95, n. 8, p. 943-951, 1991.

FERNÁNDEZ-ORTUÑO, D., TORÉS, J. A., DE VICENTE, A., & PÉREZ-GARCÍA, A. The Qo fungicides, the rise and fall of a successful class of agricultural fungicides. In: **Fungicides**. InTech, 2010.

FISCHER, J. M. M. **Caracterização de populações de *Monilinia fructicola* e resistência ao fungicida tiofanato-metílico**. Tese (Doutorado em Genética) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2015.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Base de dados estatísticos – Faostat Agriculture. Disponível em: <<http://www.fao.org.br>>. Acesso em: 15/01/2018.

FORTES, J.F.; MARTINS, O.M. Sintomatologia e controle das principais doenças. In: MEDEIROS, C.A.B.; RASEIRA, M. do C.B. (Ed.). **A cultura do pessegueiro**. Brasília: Embrapa-SPI; Pelotas: Embrapa-CPACT, 1998. p.243-264

FRAC- **Fungicide Resistance Action** Committee. Disponível em: <<http://www.frac.info/>>. Acesso em: 02/01/2018

FRANZON, R. C.; RASEIRA, M. C. B. In: RASEIRA, M. C.B.; PEREIRA, J. F. M.; CARVALHO, F. L. C. **Pessegueiro**, 1º Edição. Embrapa, Brasília, DF, 2014. 780 p.

GHINI, R.; KIMATI, H. Resistência de fungos a fungicidas. 1. ed. Jaguariúna: **Embrapa Meio Ambiente**, 2000. 78p

GISI, U.; SIEROTZKI, H.; COOK, A.; MCCAFFERY, A. Mechanisms influencing the evolution of resistance to Qo inhibitor fungicides. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 58, n. 9, p. 859-867, 2002.

HERTER, F. G.; WREGE, M.S.; FLORES, C.A. Adaptação Edafoclimática In: RASEIRA, M. C.B.; PEREIRA, J. F. M.; CARVALHO, F. L. C. **Pessegueiro**, 1º Edição. Embrapa, Brasília, DF, 2014. 780 p.

HEON, L. T. Incidence of benzimidazole and dicarboximide resistant isolates of *Monilinia fructicola* from overwintering mummies and peduncles on peach trees. **Korean J. Plant Pathol.**, 1998.

HOLB, I. J. The brown rot fungi of fruit crops (*Monilinia* spp.): II. Important features of their epidemiology. International Journal of Horticultural Science Hungary, 2004.

HOLB, I. J.; SCHNABEL, G. Effect of fungicide treatments and sanitation practices on brown rot blossom blight incidence, phytotoxicity, and yield for organic sour cherry production. **Plant Disease**, v. 89, n. 11, p. 1164-1170, 2005.



IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/5457>>. Acesso em 19/12/2017.

INDEX FUNGORIUM- Species Fungorum: Synonymy. Disponível em: <<http://www.speciesfungorum.org>>. Acesso em: 15/09/2017.

KARAOGLANIDIS, G. S.; LUO, Y.; MICHAILIDES, T. J. Competitive ability and fitness of *Alternaria alternata* isolates resistant to QoI fungicides. **Plant disease**, v. 95, n. 2, p. 178-182, 2011.

LEROUX, P.; FRITZ, R.; DEBIEU, D.; ALBERTINI, C.; LANEN, C.; BACH, J.; GREDT, M.; CHAPELAND, F. Mechanism of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea*. **Pest Management Science**, v. 58, n. 9, p. 876-888, 2002.

LEROUX, P.; WALKER, A. S. Multiple mechanisms account for resistance to sterol 14 $\alpha$ -demethylation inhibitors in field isolates of *Mycosphaerella graminicola*. **Pest management science**, v. 67, n. 1, p. 44-59, 2011.

LICHTENBERG, P. S. F., ZEVIANI, W. M., MORALES, R. G. F., MICHAILIDES, T. J., MAY-DE-MIO, L. L. Shift in *Monilinia fructicola* sensitivity to tebuconazol fungicide, and resistance survey in Southern Brazil. In: **Modern fungicides and antifungal compounds VII**. Proceedings of the 17th International Reinhardtbrunn Symposium, April 21-25 2013, Friedrichroda, Germany. Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft eV Verlag, p. 173-178, 2014.

LICHTENBERG, P. S. F.; PRIMIANO, I. V.; FISCHER, J. M.; GLIENKE, C.; AMORIM, L.; MAY DE MIO, L. L. Resistência de *Monilinia* spp. aos fungicidas do grupo Inibidores da Desmetilação (DM), Inibidores da Quinona Externa (IQe) e dos Metilo Benzimidazol Carbamatos (MBC). **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 24, p. 145-173, 2016.

LICHTENBERG, P. S., LUO, Y., MORALES, R. G., MUEHLMANN-FISCHER, J. M., MICHAILIDES, T. J., MAY DE MIO, L. L. The Point Mutation G461S in the MfCYP51 Gene is Associated with Tebuconazol Resistance in *Monilinia fructicola* Populations in Brazil. **Phytopathology**, p. PHYTO-02-17-0050-R, 2017.

LIM, T. H., JOHNSON, I., CHA, B. Characterization and Genetic Diversity of Benzimidazole-resistant and-sensitive *Monilinia fructicola* Isolates in Korea. **Plant Pathology Journal**, v. 22, n. 4, p. 369, 2006.

LUO, C.X.; COX, K. D., AMIRI, A., SCHNABEL, G. Occurrence and detection of the DMI resistance-associated genetic element 'Mona' in *Monilinia fructicola*. **Plant Disease**, v. 92, n. 7, p. 1099-1103, 2008.

LUO, C.X.; SCHNABEL, G. Adaptation to fungicides in *Monilinia fructicola* isolates with different fungicide resistance phenotypes. **Phytopathology**, v. 98, n. 2, p. 230-238, 2008a.

LUO, C. X., SCHNABEL, G. The cytochrome P450 lanosterol 14- $\alpha$  demethylase gene is a demethylation inhibitor fungicide resistance determinant in *Monilinia fructicola* field isolates from Georgia. **Appl. Environ. Microbiol.** 74:359-366, 2008b.

LUO, C. X., HU, M. J., JIN, X., YIN, L. F., BRYSON, P. K., SCHNABEL, G. An intron in the cytochrome b gene of *Monilinia fructicola* mitigates the risk of resistance development to QoI fungicides. **Pest management science**, v. 66, n. 12, p. 1308-1315, 2010.

LUPETTI, A.; DANESI, R.; CAMPA, M.; DEL TACCA, M.; STEVEN, K. Molecular basis of resistance to azole antifungals. **Trends in molecular medicine**, v. 8, n. 2, p. 76-81, 2002.

MA, Z., Y.; M., MICHAILIDES, T.J. Identification and characterization of benzimidazole resistance in *Monilinia fructicola* from stone fruit orchards in California. **Appl. Environ. Microbiol.** 69, 7145–7152, 2003.

MA, Z.; MICHAILIDES, T. J. Characterization of iprodione-resistant *Alternaria* isolates from pistachio in California. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 80, n. 2, p. 75-84, 2004.

MA, Z.; MICHAILIDES, T. J.; Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. **Crop Protection**, v. 24, n. 10, p. 853-863, 2005a.

MA, Z.; YOSHIMURA, M. A.; HOLTZ, B. A.; MICHAILIDES, T. J. Characterization and PCR-based detection of benzimidazole-resistant isolates of *Monilinia laxa* in California. **Pest Management Science**. v. 61, p. 449 -457. 2005b.

MA, Z.; LUO, Y.; MICHAILIDES, T.J. Molecular characterization of the two-component histidine kinase gene from *Monilinia fructicola*. **Pest management science**, v. 62, n. 10, p. 991-998, 2006.

MA, Z.; YAN, L.; LUO, Y.; Michailides, T. Sequence variation in the two component histidine kinase gene of *Botrytis cinerea* associated with resistance to dicarboximide fungicides. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 2007, Vol. 88. N°3, 2007.

MARTINI, C.; GUIDARELLI, M.; DI FRANCESCO, A.; CEREDI, G.; MARI, M. Characterization of thiophanate methyl resistance in Italian *Monilinia fructicola* isolates. **Journal of Plant Pathology**. v. 98, p. 75-84, 2016.

MAY-DE MIO, L. L.; MONTEIRO, L. B.; DE NAZARENO, N. R. X.; HICKEL, E. Classificação e manejo dos agroquímicos em fruteiras de caroço. In: MONTEIRO, L. B.; MAY-DE MIO, L. L.; SERRAT, B. M.; MOTTA, A. C.; CUQUEL, F. L. **Fruteiras de caroço: uma visão ecológica**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2004. p. 263-297.

MAY DE MIO, L.L.; MOREIRA, L.M.; MONTEIRO, L.B.; JUSTINIANO JÚNIOR, P.R. Infecção de *Monilinia fructicola* no período da floração e incidência de podridão-parda em frutos de pessegueiro em dois sistemas de produção. **Tropical Plant Pathology**, v.33, p.173-180, 2008.

MAY-DE MIO, L. L.; LUO, Y.; MICHAILIDES, T. J. Sensitivity of *Monilinia fructicola* from Brazil to tebuconazol, azoxystrobin, and thiophanate-methyl and implications for disease management. **Plant Disease**, v. 95, n. 7, p. 821-827, 2011.



MAY DE MIO, L.L.; GARRIDO, L.R.; UENO, B.; FARJADO, T.V.M. Doenças da cultura do pessegueiro e métodos de controle. p.355-366. In: RASEIRA, M. C.B.; PEREIRA, J. F. M.; CARVALHO, F. L. C. **Pessegueiro**, 1º Edição. Embrapa, Brasília, DF, 2014. 780p.

MIKABERIDZE A.; MCDONALD, B.A. Fitness Cost of Resistance: Impact on Management. IN: ISHII, H.; HOLLOMON, D. W. (Ed.). **Fungicide Resistance in Plant Pathogens: Principles and a Guide to Practical Management**. Springer, p. 80- 83 2015.

MONTEIRO M, JULIÃO L. Importação. Um negócio que representa ameaças, mas também oportunidades ao produtor brasileiro. **Hortifruti Brasil**, 2013. Disponível em: <<http://www.hfbrasil.org.br/>> Acesso em: 30/01/2018.

MOREIRA, L. M.; MAY-DE MIO, L. M. Controle da podridão-parda do pessegueiro com fungicidas e fosfitos avaliados em pré e pós-colheita. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 2, p. 405-411, 2009.

NIKOU, D. A. MALANDRAKIS, M. KONSTANTAKAKI, J. VONTAS, A. MARKOGLU, B. ZIOGAS. Molecular characterization and detection of overexpressed C-14 alpha-demethylase-based DMI resistance in *Cercospora beticola* field isolates. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 95, n. 1, p. 18-27, 2009.

NORTHOVER, J.; MATTEONI, J.A. Resistance of *Botrytis cinerea* to benomil and iprodiona in vineyards and greenhouse after exposure to the fungicides alone or mixed with captan. **Plant Disease**, St. Paul, v.70, p.398- 402, Apr. 1986.

OCHIAI, N., FUJIMURA, M., MOTOYAMA, T., ICHIISHI, A., USAMI, R., HORIKOSHI, K., & YAMAGUCHI, I. Characterization of mutations in the two-component histidine kinase gene that confer fludioxonil resistance and osmotic sensitivity in the os-1 mutants of *Neurospora crassa*. **Pest management science**, v. 57, n. 5, p. 437-442, 2001.

OGAWA, J. M.; ZEHR. E. I.; BIRD, G. W.; RITCHIE, D. F.; URIU, K; UYEMOTO, J. K. ed. **Compendium of stone fruit diseases**, St. Paul: APS Press, 1995. 98p.

OLIVER, R.; HEWITT, H.G. **Fungicides in crop protection**. 2nd ed. Oxfordshire: CABI Publ.; CAB International, 2014. 200 p.

OSHIMA, M., FUJIMURA, M., BANNO, S., HASHIMOTO, C., MOTOYAMA, T., ICHIISHI, A., & YAMAGUCHI, I. A point mutation in the two-component histidine kinase BcOS-1 gene confers dicarboximide resistance in field isolates of *Botrytis cinerea*. **Phytopathology**, v. 92, n. 1, p. 75-80, 2002.

OSHIMA, M.; BANNO, S.; OKADA, K.; TAKEUCHI, T.; KIMURA, M.; ICHIISHI, A.; YAMAGUCHI, I.; FUJIMURA, M. Survey of mutations of a histidine kinase gene BcOS1 in dicarboximide-resistant field isolates of *Botrytis cinerea*. **Journal of General Plant Pathology**, v. 72, n. 1, p. 65-73, 2006.

PARKER, D. M., ZHANG, N., SMART, C. D., KOELLER, W. D. Polymorphism of 14 alpha- demethylase gene (CYP51) in brown rot pathogen *Monilinia fructicola* from a resistant orchard in New York State. (Abstr.) **Phytopathology**, 96, 2006.

PARNELL, S.; GILLIGAN, C. A.; VAN DEN BOSCH, F. Small-scale fungicide spray heterogeneity and the coexistence of resistant and sensitive pathogen strains. **Phytopathology**, v. 95, n. 6, p. 632-639, 2005.

PARREIRA, D.F.; NEVES, W.S.; ZAMBOLIM, L. Resistência de fungos a fungicidas inibidores de quinona. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, São Luís, v.3, n.2, p.24-34, 2009.

PAVANELLO, E.P.; BRACKMANN, A; THEWES, F.R.; BOTH, V.; DOS SANTOS, J. R. A.; SCHORR, M. R. W. Eficiência de fungicidas no controle da podridão-parda do pessegueiro e sua relação com parâmetros fisiológicos dos frutos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, n. 1, p. 67-76, 2015.

PENROSE, L. J. Prolonged field persistence of resistance to benomil in *Monilinia fructicola*. **Crop Protection**, v. 9, n. 3, p. 190-192, 1990.

PEREIRA, W. V., PRIMIANO, I. V., MORALES, R. G., PERES, N. A., AMORIM, L., & MAY DE MIO, L. L. Reduced Sensitivity to Azoxystrobin of *Monilinia fructicola* Isolates From Brazilian Stone Fruits is Not Associated With Previously Described Mutations in the Cytochrome b Gene. **Plant Disease**, v. 101, n. 5, p. 766-773, 2017.

POMMER, E. H.; LORENZ, G. Resistance of *Botrytis cinerea* Pers. to dicarboximide fungicides- a literature review. **Crop protection**, v. 1, n. 2, p. 221-230, 1982.

PRINGLE, A; TAYLOR, J. W. The fitness of filamentous fungi. **Trends in microbiology**, v. 10, n. 10, p. 474-481, 2002.

RASEIRA, M.C.; QUEZADA, A.C. Classificação Botânica, Origem e Evolução. **Frutas do Brasil - Pêssego Produção**. EMBRAPA, 2003. p. 31-35.

RITCHIE, D. F. Mycelial growth, peach fruit-rotting capability, and sporulation of strains of *Monilinia fructicola* resistant to dichloran, iprodiona, procymidone, and vinclozolin. **Phytopathology**, v. 73, p. 44-47, 1983.

RODRIGUES, M; A.; T. **Classificação de fungicidas de acordo com o mecanismo de ação proposto pelo FRAC**. 2006. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista Julio Mesquita Filho.

RUSSELL, P. E. Sensitivity baselines in fungicide resistance research and management. Brussels: **Crop Life International**, 2002.

SACHS, S.; CAMPOS, A.D. O pessegueiro. In: MEDEIROS, C.A. B; RASEIRA, M.C. B (Ed). **A cultura do pessegueiro**. Brasília: EMBRAPA, 1998, 13-19.

SCHNABEL, G., BRYSON, P. K., BRIDGES, W. C., BRANNEN, P. M. Reduced sensitivity in *Monilinia fructicola* to propiconazole in Georgia and implications for disease management. **Plant Dis.** 88:1000-1004, 2004.

SIEROTZKI, H., WULLSCHLEGER, J., GISI, U. Point mutation in cytochrome b gene conferring resistance to strobilurin fungicides in *Erysiphe graminis* f. sp. tritici field isolates. **Pestic. Biochem. Physiol.** 68:107-112, 2000a.

SIEROTZKI, H., PARISI, S., STEINFELD, U., TENZER, I., POIREY, S., GISI, U. Mode of resistance to respiration inhibitors at the cytochrome bc1 enzyme complex of *Mycosphaerella fijiensis* field isolates. **Pest Manage. Sci.** 56:833-841, 2000b.

SIEROTZKI, H., FREY, R., WULLSCHLEGER, J., PALERMO, S., KARLIN, S., GODWIN, J., GISI, U. Cytochrome b gene sequence and structure of *Pyrenophora teres* and *P. tritici-repentis* and implications for QoI resistance. **Pest management science**, v. 63, n. 3, p. 225-233, 2007.

SONODA, R. M.; OGAWA, J. M. Growth rate of *Monilinia fructicola* resistant and sensitive to benomil on potato-dextrose agar and on peach fruit. **Plant disease** (USA), 1982.

SOUZA, D. C. **Progresso temporal e padrão espacial de epidemias da podridão-parda do pessegueiro**. Tese de Doutorado. ESALQ, 2006.

SOUZA, D. C.; FAZZA, A.C.; CAMARGO, L. A.; MAY DE MIO, L. L.; ANGELI, S. S.; AMORIM, L. First report of *Monilinia laxa* causing brown rot in peaches in Brazil. **Phytopathology**, St. Paul, v.98, p.148. 2009.

SANOAMUANG, N.; GAUNT, R. E. Persistence and fitness of carbendazim-and dicarboximide-resistant isolates of *Monilinia fructicola* (Wint.) Honey in flowers, shoots and fruit of stone fruit. **Plant pathology**, v. 44, n. 3, p. 448-457, 1995.

STATISTA- The Statistics Portal. **Global production of fruit by variety 2014**. Disponível em: < <https://www.statista.com/statistics/264001/worldwide-production-of-fruit-by-variety/>>. Acesso em: 16/01/2018.

STAUB, T. Fungicide resistance: Practical experience with antiresistance strategies and the role of integrated use. **Annual review of phytopathology**, v. 29, n. 1, p. 421-442, 1991.

VILLANI, S. M.; COX, K. D. Characterizing fenbuconazole and propiconazole sensitivity and prevalence of 'Mona' in isolates of *Monilinia fructicola* from New York. **Plant disease**, v. 95, n. 7, p. 828-834, 2011

WATSON, W. A.; ZEHR, E. I.; GRIMES, L. W. Influence of temperature and wetting period on inoculum production by *Monilinia fructicola* in peach twig cankers. **Plant disease**, v. 86, n. 6, p. 666-668, 2002.

WEST, A. H.; STOCK, A. M. Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends in biochemical sciences*, v. 26, n. 6, p. 369-376, 2001.

WYAND, R. A.; BROWN, J. K. M. Sequence variation in the CYP51 gene of *Blumeria graminis* associated with resistance to sterol demethylase inhibiting fungicides. **Fungal Genetics and Biology**, v. 42, n. 8, p. 726-735, 2005.

ZHU, F.; BRYSON, P. K.; SCHNABEL, G. Influence of storage approaches on instability of propiconazole resistance in *Monilinia fructicola*. **Pest management science**, v. 68, n. 7, p. 1003-1009, 2012.

## APÊNDICE A

**TABELA 16 - CRESCIMENTO MICELIAL (mm) E PERCENTAGEM DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL (%ICM) DOS FENÓTIPOS EXTREMAMENTE SENSÍVEIS (SS) DE *M. fructicola* NA DOSE DISCRIMINATÓRIA DE 5µL.mL<sup>-1</sup> DE IPRODIONA.**

Isolado	Dc (mm) <sup>1</sup>			Fenótipo
	0 µL.mL <sup>-1</sup>	5µL.mL <sup>-1</sup>	%ICM	
100	16,67	0	100	SS
115	16,25	0	100	SS
132	29,66	0	100	SS
152	25,62	0	100	SS
161	32,55	0	100	SS
162	10,12	0	100	SS
181	32,75	0	100	SS
187	30,41	0	100	SS
190	23,92	0	100	SS
200	25	0	100	SS
213	17,82	0	100	SS
311	27,41	0	100	SS
317	13,08	0	100	SS
321	24,03	0	100	SS
335	27,17	0	100	SS
340	24,65	0	100	SS
341	30,47	0	100	SS
342	29,29	0	100	SS
343	22,33	0	100	SS
345	8,33	0	100	SS
346	23,67	0	100	SS
400	17,92	0	100	SS
630	22,59	0	100	SS
638	24	0	100	SS
639	20,25	0	100	SS
642	21,46	0	100	SS
646	30,14	0,07	100	SS
753	25,32	0	100	SS
808	14,18	0	100	SS
826	14,84	0	100	SS
904	15,32	0	100	SS
929	20,74	0	100	SS
935	26,79	0	100	SS
941	18,24	0	100	SS
952	20,55	0	100	SS
960	33,37	0	100	SS
969	24,79	0	100	SS
970	34,25	0	100	SS
977	28	0	100	SS
988	13,25	0	100	SS

(...)

Isolado	0 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	%ICM	Fenótipo
996	25,17	0	100	SS
1002	34,72	0	100	SS
1004	23,84	0	100	SS
1008	11,7	0	100	SS
1010	44,28	0	100	SS
1012	35,1	0	100	SS
1020	10,67	0	100	SS
1021	28,12	0	100	SS
1023	38,92	0	100	SS
1043	26,39	0	100	SS
1050	28,75	0	100	SS
1054	17,75	0	100	SS
1069	10,92	0	100	SS
1071	27,67	0	100	SS
1086	12,77	0	100	SS
1099	28,92	0	100	SS
A64	18,83	0	100	SS
A58	16,05	0	100	SS
A72	10,61	0	100	SS
CL5	14,17	0	100	SS
CL15	16,42	0	100	SS
CL26	23,35	0	100	SS
CL27	33	0	100	SS
CL43	22,01	0	100	SS
C25	15,88	0	100	SS
C26	21,36	0,57	97,33	S
C64	15,72	0	100	SS
S19	27,39	0	100	SS
S25	31,91	0	100	SS
S35	24,2	0	100	SS
S43	28,82	0	100	SS
PR17-78	23,85	0	100	SS
PR17-82	15,86	0	100	SS
PR17-07	15,02	0	100	SS
PR17-08	13,43	0	100	SS
PR17-09	13,08	0	100	SS
PR17-10	13,07	0	100	SS
PR17-11	15,12	0	100	SS
PR17-13	9,26	0	100	SS
PR17-16	15,16	0	100	SS
PR17-17	14,89	0	100	SS
PR17-19	12,19	0	100	SS
PR17-22	10,95	0	100	SS

(...)

<b>Isolado</b>	<b>0 µL.mL<sup>-1</sup></b>	<b>5µL.mL<sup>-1</sup></b>	<b>%ICM</b>	<b>Fenótipo</b>
PR17-23	15,1	0	100	SS
PR17-25	13,29	0	100	SS
PR17-30	23,42	0	100	SS
PR17-31	12,38	0	100	SS
PR17-79	12,07	0	100	SS
PR17-32	13,84	0	100	SS
PR17-77	15,13	0	100	SS
PR17-37	14,06	0	100	SS
PR17-80	17,69	0	100	SS
PR17-81	25,75	0	100	SS
SP17-13	21,84	0	100	SS
SP17-01	25,71	0	100	SS
SP17-17	21,6	0	100	SS
SP17-03	37,35	0	100	SS
SP17-24	23,77	0	100	SS
SP17-30	21,16	0	100	SS
SP17-19	23,12	0	100	SS
SP17-21	21,17	0	100	SS
SP17-23	23,29	0	100	SS
SP17-53	15,16	0	100	SS
SP17-32	14,89	0	100	SS
SP17-34	22,26	0	100	SS
SP17-55	19,72	0	100	SS
SP17-36	18,95	0	100	SS
SP17-11	24,76	0	100	SS
PR17-41	11,7	0	100	SS
PR17-42	13,6	0	100	SS
PR17-44	10,3	0	100	SS
PR17-63	13,13	0	100	SS
PR17-64	14,99	0	100	SS
PR17-46	16,58	0	100	SS
PR17-47	13,89	0	100	SS
PR17-48	12,26	0	100	SS
PR17-73	13,32	0	100	SS
PR17-49	13,49	0	100	SS
PR17-50	24,1	0	100	SS
PR17-66	25,47	0	100	SS
PR17-83	26,18	0	100	SS
PR17-51	21,46	0	100	SS
PR17-52	19,4	0	100	SS
PR17-53	25,43	0	100	SS
PR17-54	26,77	0	100	SS
PR17-57	23,25	0	100	SS
PR17-58	26,74	0	100	SS
PR17-59	25,43	0	100	SS
PR17-69	6,87	0	100	SS

**TABELA 17 - PADRÃO DE RESISTÊNCIA DE ISOLADOS de *Monilinia fructicola* AOS INIBIDORES DA DESMETILAÇÃO C14 CLASSIFICADOS PELA DOSE DISCRIMINATÓRIA DE 0,3 µg. mL<sup>-1</sup>**

Tebuconazole <sup>1</sup>			Difenoconazole <sup>1</sup>		Propiconazole <sup>1</sup>		Prothioconazole <sup>1</sup>	
Isolado	% Inibição	Padrão de Resistência	% Inibição	Padrão de Resistência	% Inibição	Padrão de Resistência	% Inibição	Padrão de Resistência
100	93	S	96,85	S	100	S	100	S
115	100	S	93,98	S	100	S	100	S
181	100	S	93,03	S	100	S	100	S
190	100	S	96,98	S	100	S	100	S
213	83,14	S	69,27	R	100	S	100	S
311	100	S	86,57	S	100	S	100	S
317	31,21	R	74,88	S	91,51	S	97,74	S
321	100	R	87,47	S	100	S	100	S
335	100	S	99,93	S	100	S	100	S
340	100	S	100	S	100	S	100	S
342	100	S	76,24	R	100	S	100	S
343	56,72	R	74,75	R	90,27	S	97,48	S
345	12	R	55,83	R	100	S	100	S
400	90,23	S	88,27	S	100	S	100	S
638	100	S	86,75	S	100	S	100	S
639	100	S	100	S	100	S	100	S
802	28,89	R	78,30	R	100	S	66,07	R
807	40	R	81,37	S	100	S	93,44	S
960	100,00	R	100	S	100	S	100	S
945	33,68	R	80,24	S	95,13	S	89,13	S
951	27,18	R	77,43	R	89,65	S	97,84	S
969	100	S	96,47	S	100	S	100	S
977	100	S	100	S	100	S	100	S
996	100	S	86,07	S	100	S	100	S
1020	100	S	78,92	R	100	S	100	S
1023	100	S	100	S	100	S	100	S
1069	100	S	90,81	S	100	S	100	S
1099	100	S	95,68	S	100	S	100	S
A31	28,74	R	53,86	R	87,49	S	100	S
A64	100	S	97,71	S	100	S	100	S
A58	100	S	100	S	100	S	100	S
A72	100	S	97,71	S	100	S	100	S
CL5	23,53	R	69,42	R	100	S	71,25	R
CL15	21,25	R	64,42	R	100	S	85,14	S
CL26	16,92	R	49,57	R	27,08	R	100	S
CL27	91,61	S	85,12	S	100	S	100	S
CL43	30,69	R	67,17	R	96,45	S	87,82	S
CL45	100	S	81,75	S	100	S	100	S
C3	100	S	59,33	R	96,98	S	92,22	S
C24	40,71	R	100	S	100	S	100	S
C25	20,58	R	69,14	R	87,21	S	87,74	S
C26	100	S	100	S	100	S	100	S
C64	100	S	55,81	R	100	S	85,26	S
C66	74,72	R	77,28	R	100	S	84,90	S
839	100	S	78,74	R	100	S	100	S
S19	53,31	R	96,23	S	100	S	100	S
S25	64,59	R	80,05	S	93,35	S	84,33	S
S28	38,63	R	57,36	R	57,10	R	91,36	S
S35	69,19	R	100	S	100	S	100	S
S37	12,02	R	71,98	R	35,57	R	71,98	R
S43	30,75	R	69,28	R	91,13	S	81,43	S
S48	40,27	R	21,78	R	34,33	R	100	S



**TABELA 18 - PADRÃO DE RESISTÊNCIA DE ISOLADOS DE *Monilinia fructicola* AOS INIBIDORES DA QUINONA EXTERNA CLASSIFICADOS PELAS DOSES DISCRIMINATÓRIS DE 1,0 E 0,1 µg. mL<sup>-1</sup>**

1

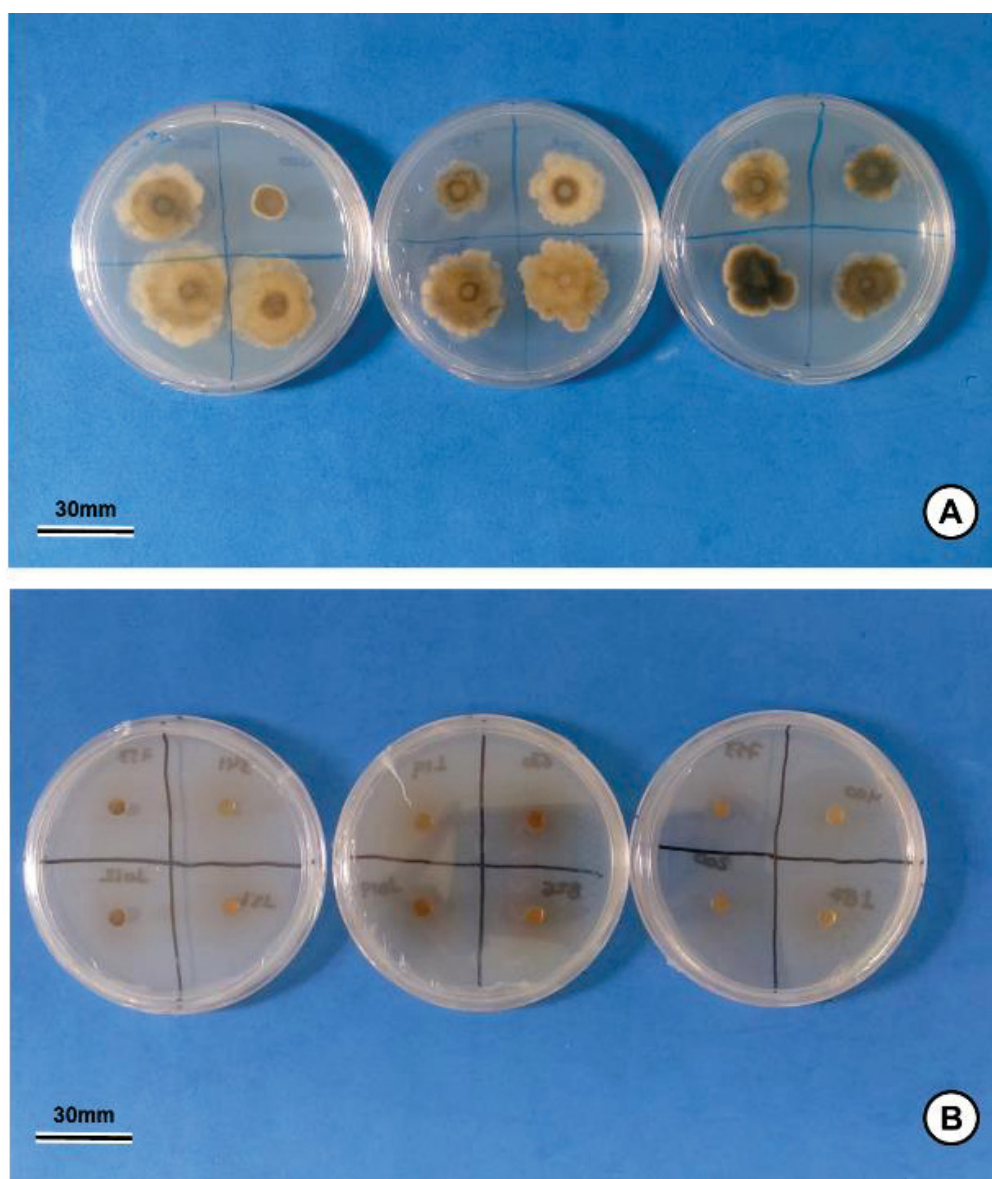
Isolado	Azoxistrobina <sup>1</sup>		Piraclostrobina <sup>1</sup>		Picoxistrobina <sup>1</sup>	
	% Inibição 1 ppm	Padrão de Resistência	% Inibição 0,1 ppm	Padrão de Resistência	% Inibição 0,1 ppm	Padrão de Resistência
100	95,67	S	98,67	S	100,00	S
115	92,64	S	100,00	S	100,00	S
181	98,20	S	100,00	S	100,00	S
190	98,54	S	100,00	S	100,00	S
213	100,00	S	81,69	S	11,53	R
311	98,23	S	84,34	S	6,02	R
317	84,97	S	100,00	S	97,55	S
321	100,00	S	99,29	S	97,52	S
335	93,71	S	100,00	S	92,72	S
340	99,20	S	100,00	S	100,00	S
343	30,71	R	79,85	S	79,85	S
345	99,66	S	79,18	S	2,39	R
400	100,00	S	100,00	S	43,08	R
638	98,97	S	100,00	S	100,00	S
639	100,00	S	99,33	S	12,00	R
802	15,88	R	52,04	S	21,09	R
807	21,28	R	74,41	S	16,16	R
945	60,42	S	100,00	S	100,00	S
951	16,55	R	92,01	S	34,03	R
969	6,25	R	79,45	S	35,27	R
960	79,11	S	100,00	S	48,74	R
977	99,66	S	98,57	S	100,00	S
996	100,00	S	97,23	S	99,31	S
1020	98,31	S	100,00	S		
1023	99,31	S	99,66	S	100,00	S
1069	97,95	S	84,08	S	100,00	S
1099	59,66	S	100,00	S	100,00	S
A31	3,39	R	84,41	S	50,85	S
A64	4,38	R	100,00	S	41,00	R
A58	91,76	S	100,00	S	99,30	S
A72	97,29	S	99,31	S	32,44	R
CL5	3,72	R	51,04	S	1,74	R
CL15	53,87	S	100,00	S	99,66	S
CL25	95,39	S	67,82	S	29,89	R
CL26	89,00	S	86,33	S	27,50	R
CL27	99,31	S	100,00	S	62,94	S
CL43	68,49	S	96,59	S	46,42	R
CL45	84,75	S	100,00	S	92,86	S
C3	98,90	S	100,00	S	100,00	S
C24	3,18	R				
C25	4,39	R	90,51	S	48,14	R
C26	98,95	S				
C64	100,00	S	100,00	S	99,64	S
C66	89,00	S	85,57	S	98,61	S
839	7,07	R	78,67	S	3,79	R
S19	32,50	R	92,31	S	26,92	R
s25	100,00	S	100,00	S	100,00	S
S28	99,66	S	99,33	S	100,00	S
S35	7,74	R				
S37	7,69	R	83,16	S	14,48	R
S43	94	S	77,33	S	84,27	S
S48	100	S	98,33	S	100,00	S

**TABELA 19 - PADRÃO DE RESISTÊNCIA DE ISOLADOS DE *Monilinia fructicola* AOS METIL BENZIMIDAZÓIS CARBAMATOS CLASSIFICADOS PELAS DOSES DISCRIMINATÓRIAS DE 1 e 500µg. mL<sup>-1</sup>**

Isolado	Tiofanato metílico <sup>1</sup>			Carbendazim <sup>1</sup>		
	% Inibição 1µg.mL <sup>-1</sup>	% Inibição 500 µg.mL <sup>-1</sup>	Padrão de Resistência	% Inibição 1µg.mL <sup>-1</sup>	% Inibição 500 µg.mL <sup>-1</sup>	Padrão de Resistência
100	2,64	100	LR	80,79	100	S
115	100	100	S	100	100	S
181	5,37	-4,39	HR	0,26	-0,43	HR
190	100	100	S			S
213	100	100	S	100	100	S
311	100	100	S	31,27	41,06	HR
317	100	100	S	100	100	S
321	-19,87	27,91	HR			
335	9,41	100	LR	6,93	100	LR
340	100	100	S	100	100	S
342	-7,36	100	LR	-3,45	100	LR
343	100	100	S	100	100	S
345	100	100	S	100	100	S
400	93,24	100	S	100	100	S
638	100	100	S			
639	-8,57	100	LR			
802	100	100	S	100	100	S
807	100	100	S	100	100	S
960	19,63	100	LR	44,50	100	LR
945	100	100	S			
951	100	100	S	86,24	100	S
969	2,8	2,19	HR	-7,89	-16,58	HR
977	-3,29	100	LR	20,74	100	LR
996	14,26	20,29	HR			
1020	100	100	S	100	100	S
1023	-32,68	100	LR	0,67	100,00	LR
1069	100	100	S	100	100	S
1099	100	100	S			S
A31	100	100	S			S
A64	100	100	S	100	100	S
A58	100	100	S	100	100	S
A72	-33,6	100	LR			
CL5	100	100	S			
CL15	100	100	S	100	100	S
CL26	100	100	S	100	100	S
CL27	100	100	S	100	100	S
CL43	100	100	S	100	100	S
CL45	-0,15	100	LR	30,82	100	LR
C3	100	100	S	100	100	S
C24	-3,86	100	LR	3,41	100	LR
C25	100	100	S	100	100	S
C26	100	100	S	100	100	S
C64	100	100	S	100	100	S
C66	-4,1	100	LR	14,22	100	LR
839	1,24	100	LR	8,07	100	LR
S19	100	100	S	100	100	S
S25	100	100	S	100	100	S
S28	13	100	LR	10	100	LR
S35	100	100	S	100	100	S
S37	100	100	S	100	100	S
S43	100	100	S	100	100	S
S48				-7,68	100	LR

## APÊNDICE B

**FIGURA 9** - PLUG MICELIAL DE 5 MM COLETADOS DE COLÔNIAS DE 7 DIAS DE *Monilinia fructicola* EM MEIO BDA SEM FUNGICIDA (A) E EM MEIO BDA COM 5 µg/mL DE IPRODIONA APÓS 5 DIAS

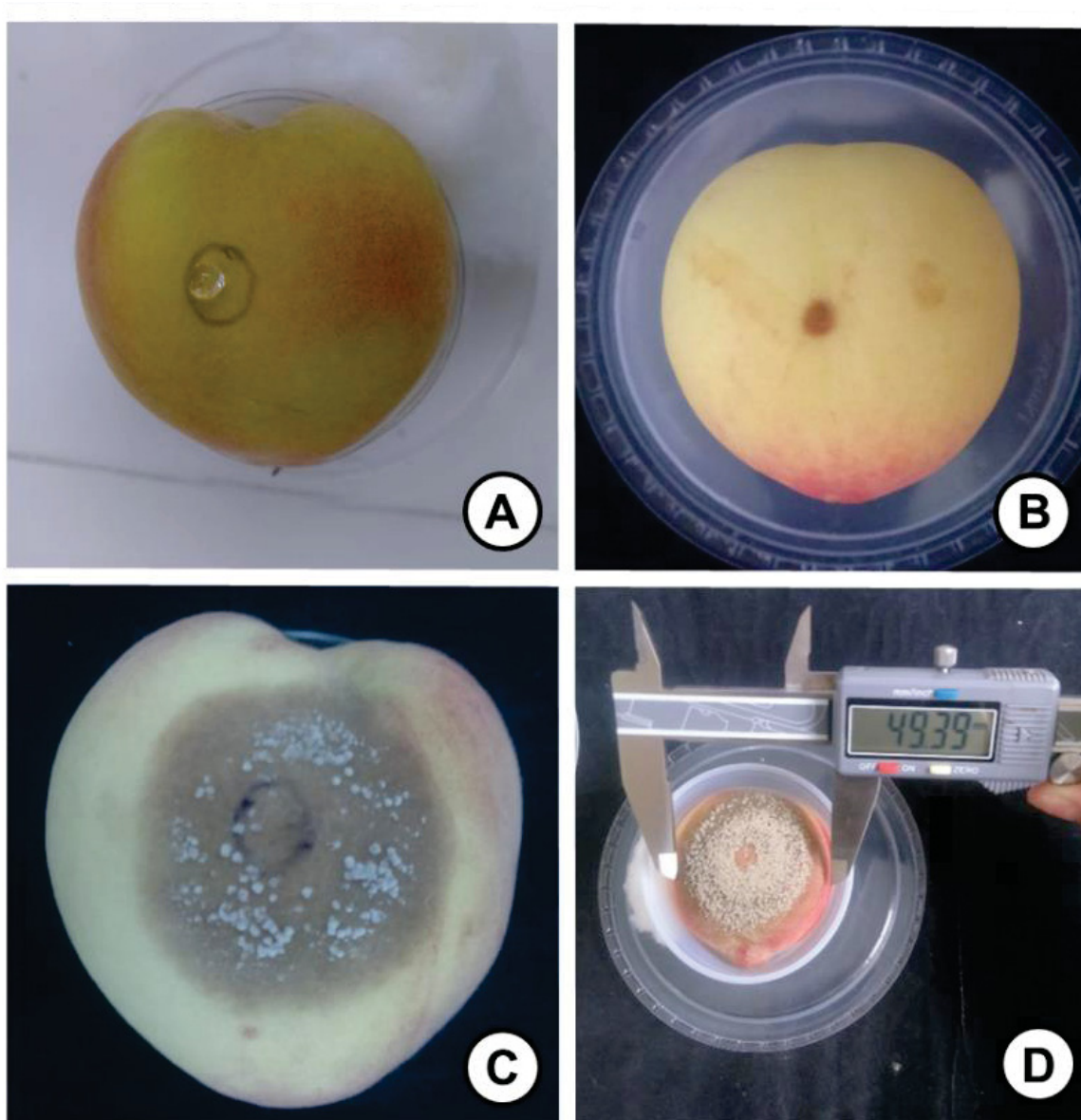


**FIGURA 10-** METODOLOGIA UTILIZADA PARA OS EXPERIMENTOS EM FRUTOS *in natura*. A. DESINFESTAÇÃO DOS FRUTOS B. FRUTOS DEIXADOS AO AR LIVRE PARA COMPLETA SECAGEM. C. TRATAMENTO DOS FRUTOS COM OS FUNGICIDAS. D. FRUTOS INDIVIDUALIZADOS E DEIXADOS EM RECIPIENTES PLÁSTICOS EM SALA COM TEMPERATURA CONTROLADA ( $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ )

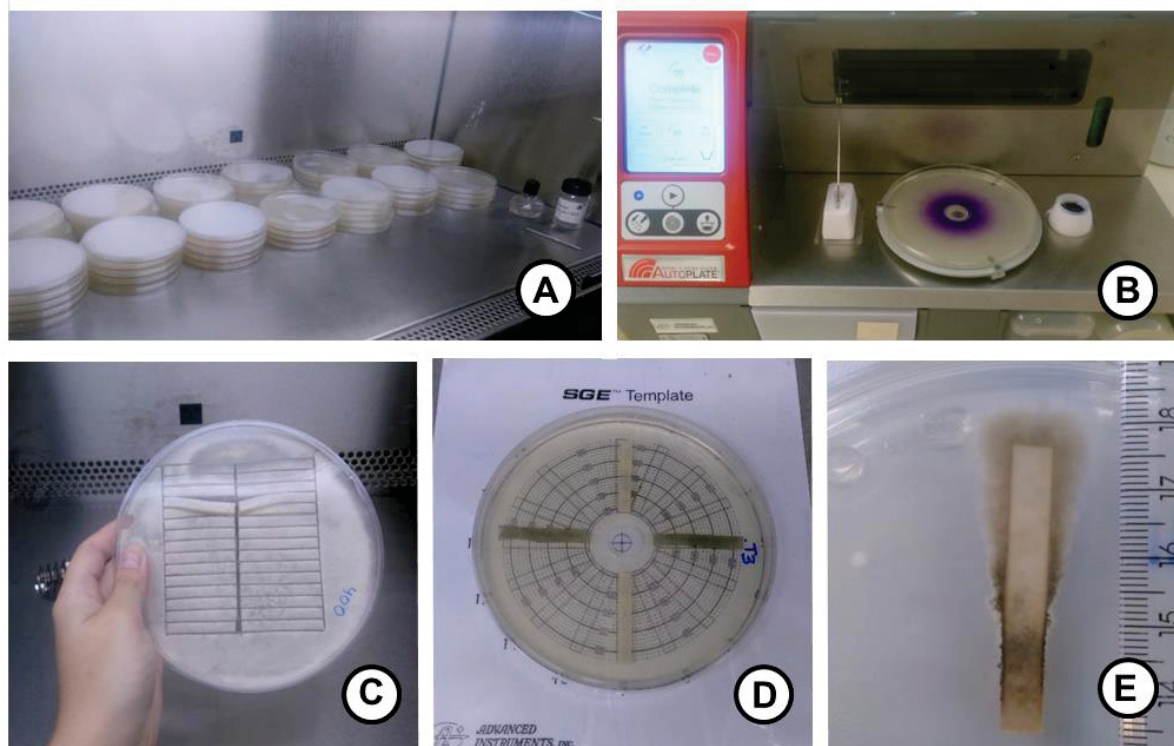




**FIGURA 11-** METODOLOGIA UTILIZADA PARA OS EXPERIMENTOS EM FRUTOS *in natura*. A. INOCULAÇÃO DE *M. fructicola* NOS FRUTOS COM 40  $\mu$ L DE SUSPENSÃO NA CONCENTRAÇÃO DE  $10^5$  CONÍDIOS. B. PERÍODO DE INCUBAÇÃO (TEMPO DECORRIDO ENTRE A INOCULAÇÃO ATÉ O APARECIMENTO DO SINTOMA CAUSADO POR *M. FRUCTICOLA*). C. PERÍODO DE LATÊNCIA (TEMPO DECORRIDO ENTRE A INOCULAÇÃO ATÉ O APARECIMENTO DOS SINAIS/ ESPORULAÇÃO DE *Monilinia fructicola*). D. MEDIÇÃO DO DIÂMETRO DA LESÃO NO 4º DIA APÓS INOCULAÇÃO.



**FIGURA 12-** METODOLOGIA UTILIZADA PARA DETERMINAÇÃO DA  $EC_{50}$ . A. PLACAS DE POLIESTIRENO 15X15MM CONTENDO MEIO BDA +ÁGAR. B. APARELHO SPIRAL PLATE. C. COLÔNIA DE *Monilinia fructicola* COM 3 DIAS DE IDADE CORTADAS EM TIRAS. D. TIRAS TRANSFERIDAS PARA O MEIO COM E SEM O FUNGICIDA. E. MEDIÇÃO DO CRESCIMENTO RADIAL DA COLÔNIA.





**FIGURA 13-** METODOLOGIA UTILIZADA PARA DETERMINAÇÃO DA AGRESSIVIDADE DOS FENÓTIPOS DE *Monilinia fructicola* EM PÉTALAS. A. FLORES DE PESSEGUEIRO. B. PÉTALAS DESTACADAS E COLOCADAS EM NÚMERO DE 10 EM CAIXAS TIPO *gerbox* COM PEDAÇOS UMEDECIDOS DE ALGODÃO. C. DEPOSIÇÃO DE 20 $\mu$ L DE SUSPENSÃO DE ESPOROS ( $5 \times 10^3$ ) DE *M. fructicola* NO CENTRO DE CADA PÉTALAS. D. SURGIMENTO DOS SINTOMAS EM PÉTALAS E AVALIAÇÃO DA INCIDÊNCIA.

